

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Einfluß von Gestagenen
auf den Arzneimittelstoffwechsel in vitro
und zum Metabolismus von Metyrapon

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus Hubert Tüttenberg
aus Passau

Mainz 1975

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Einfluß von Gestagenen auf den Arzneimittelstoffwechsel in vitro und zum Metabolismus von Metyrapon

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus Hubert Tüttenberg
aus Passau

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein
Referent: Professor Dr. G. F. Kahl
Korreferent: Professor Dr. K. J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 05. 1975

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
1. Der mikrosomale oxydative Arzneimittelstoffwechsel	1
2. Der mikrosomale reduktive Arzneimittelstoffwechsel	6
3. Beziehungen zwischen Steroid- und Arzneimittelstoffwechsel	8
4. Ziel der Arbeit	13
METHODEN	15
1. Vorbehandlung der Tiere und Mikrosomenpräparation	15
2. Spektralanalytische Untersuchungen	16
3. Versuche zur Hemmwirkung von Gestagenen auf den Arzneimittelstoffwechsel	17
a. Inkubationssystem	17
b. pNA-Demethylierung	17
c. Anilin-Hydroxylierung	18
d. Gestagenzugabe zum Inkubationssystem	19
4. Untersuchungen zum mikrosomalen Metyraponstoffwechsel	20
a. Inkubationssystem	20
b. Prüfung der Sauerstoffabhängigkeit des Metyraponmetabolismus	20
c. Trennung der Metabolite	21
5. Materialien	22
6. Auswertung der Versuche	22
a. Spektrale Untersuchungen	22
b. Versuche zur Hemmung des mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsels	23
ERGEBNISSE	24
1. Spektralanalytische Untersuchungen	24
2. Hemmung der pNA-Demethylierung durch Gestagene	26
3. Hemmung der Anilinhydroxylierung durch Gestagene	31

4. Untersuchungen zum Stoffwechsel von Metyra- rapon in Lebermikrosomen	36
a. Nachweis dreier Metyraponmetabolite	36
b. Sauerstoffabhängigkeit des Metyrapon- metabolismus	38
c. Induzierbarkeit des O_2 -abhängigen Stoff- wechsels von Metyrapon durch Phenobar- bitalvorbehandlung	38
DISKUSSION	42
1. Hemmwirkung der synthetischen Gestagene in vitro	42
2. Mögliche klinische Bedeutung der Hemm- wirkung der Gestagene	44
3. Der Stoffwechsel von Metyrapon in Leber- mikrosomen	46
4. Vergleich von Metyrapon- und Steroidstoff- wechsel	46
5. Mögliche Zusammenhänge zwischen dem O_2 - abhängigen Metabolismus und dem Hemm- mechanismus von Metyrapon	47
ZUSAMMENFASSUNG	49
LITERATURVERZEICHNIS	50

E I N L E I T U N G

1. Der mikrosomale oxydative Arzneimittelstoffwechsel

Arzneimittel und andere lipophile Substanzen, die dem Körper zugeführt werden und nicht im Intermediärstoffwechsel Verwendung finden, müssen meist, um ausgeschieden werden zu können, zunächst in polarere, wasserlösliche Verbindungen überführt werden. Hierzu stehen dem Organismus Enzymsysteme zur Verfügung, die die Fremdstoffe oxydieren, reduzieren oder hydrolysieren. Als zweiter Schritt ist der Ausscheidung dann häufig noch eine Konjugation, z.B. mit Glucuronsäure, vorgeschaltet. Der erste Schritt führt oft zu einer Wirkungsverminderung bzw. Entgiftung der Fremdstoffe, doch gibt es auch Fälle, wo erst durch den Abbau toxische Metabolite entstehen, wie bei einigen Carzinogenen und den Phosphorsäureestern. Die zur Metabolisierung von Fremdstoffen erforderlichen Enzymsysteme kommen in allen Organen vor, die entscheidende Rolle spielt aber die Leber. In der Leberzelle sind die Enzyme hauptsächlich im glatten Anteil (smooth surface) des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Das endoplasmatische Retikulum ist ein submikroskopisches System von Membranen im Zellplasma, das außer dem glatten noch einen rauhen Anteil (rough surface) besitzt, der hauptsächlich der Proteinsynthese dient. Das präparatorische Korrelat des endoplasmatischen Retikulums stellen die Mikrosomen dar, die aus den Zellen durch verschiedene Zentrifugationsschritte gewonnen werden (CLAUDE, 1938; PALADE, 1956).

Der oxydative Abbau von verschiedenen Fremdstoffen wird in der Leberzelle von demselben Enzymsystem bewirkt. Es handelt sich meist um Hydroxylierungen, z.B. bei Anilin (POSNER et al., 1956) und Dealkylierungen, z.B. bei Amidopyrin (BRODIE und AXELROD, 1950) und p-Nitroanisol (NETTER und SEIDEL, 1964). Das Enzymsystem be-

steht aus einem NADPH-verbrauchenden Elektronentransportsystem (AXELROD, 1955; MITOMA et al., 1956; GILLETTE et al., 1957; La DU et al., 1955) mit dem Flavoprotein Cytochrom-P-450-Reduktase, das der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (WILLIAMS und KAMIN, 1962) entspricht, und einer terminalen Oxydase, dem Cytochrom P-450 (COOPER et al., 1965 a; OMURA et al., 1965).

Ob zwischen dem Flavoprotein und dem Cytochrom P-450 noch ein anderes Enzym, das nicht hämgebundenes Eisen enthält, eingeschaltet ist, ist umstritten (DALLNER et al., 1966; MIYAKE et al., 1968). Das Cytochrom P-450 bindet sowohl das Substrat als auch molekularen Sauerstoff aus der Atmosphäre (HAYAISHI et al., 1956; POSNER et al., 1961). Ein Atom des gebundenen Sauerstoffs wird in das zu oxydierende Substrat eingebaut, das andere zu H_2O reduziert. Dieser Reaktionstyp entspricht einer mischfunktionellen Oxydation nach MASON (1957).

Dieses Enzymsystem dient in den Lebermikrosomen nicht nur der mischfunktionellen Oxydation von Fremdstoffen, sondern auch dem Abbau körpereigener Stoffe, wie der ω -Oxydation von Fettsäuren (WADA et al., 1968; DAS et al., 1968) und dem Abbau von Steroiden (DAS et al., 1968). Die Steroide sind nach KUNTZMAN et al. (1964) als natürliche Substrate dieses Enzymsystems anzusehen.

Auch in den Mitochondrien der Nebennierenrinde wird zu einigen Schritten der Steroidbiosynthese ein prinzipiell ähnlich aufgebautes Enzymsystem verwendet. Dieses vermittelt die C_{11} -Hydroxylierung (ESTABROOK et al., 1963), die Cholesterol-Seitenkettenspaltung (BRYSON und SWEAT, 1968) und die C_{21} -Hydroxylierung (SWEAT et al., 1969). In der Nebennierenrinde ist dabei die Existenz des zwischen Flavoprotein und Cytochrom P-450 eingeschalteten Enzyms nachgewiesen (COOPER et al., 1968).

Das Cytochrom P-450, ein Cytochrom vom b-Typ, ist neben dem Cytochrom b_5 (STRITTMATTER und BALL, 1954), dessen Beziehung zum Fremdstoff-Stoffwechsel noch nicht völlig

geklärt ist (ESTABROOK et al., 1968), das einzige in Mikrosomen vorkommende Hämoprotein. In reduziertem Zustand bildet es, wie die meisten Hämoproteine, mit Kohlenmonoxid einen Komplex (OMURA und SATO, 1962). Dementsprechend kommt es bei Anwesenheit von CO zu einer Hemmung der Hydroxylierungen in Leber und Nebennierenrinde (ESTABROOK et al., 1963). Das Spektrum des Cytochrom P-450-CO-Komplexes zeigt ein Absorptionsmaximum bei 450 nm (ESTABROOK et al., 1963), woher das Cytochrom seinen Namen hat (OMURA und SATO, 1964). Durch Licht der Wellenlänge 450 nm kann der Komplex gespalten und die Stoffwechselhemmung aufgehoben werden (COOPER et al., 1965a). Mit speziellen Methoden kann auch das Absolutspektrum von Cytochrom P-450 aufgezeichnet werden (KINOSHITA und HORIE, 1967). Es zeigt eine Soret-Bande bei 414 bzw. 418 nm (reduziert bzw. oxydiert) (REMMER et al., 1969; HILDEBRANDT und ESTABROOK, 1969).

NARASIMHULU et al. beobachteten 1965 bei der Zugabe von 17-Hydroxyprogesteron zu NNR-Mikrosomen eine Veränderung im Differenzspektrum zwischen substrathaltiger und substratloser Mikrosomensuspension. Das Ausmaß dieser Veränderung ist abhängig von der Substrat- und der Cytochrom P-450-Konzentration, was eine direkte Bindung des Substrats an eine aktive Stelle des Cytochroms nahelegt (COOPER et al., 1965b). Als erster Schritt zum oxydativen Fremdstoffmetabolismus ist die Bildung eines Komplexes zwischen dem Substrat und dem Cytochrom P-450 zu sehen (REMMER et al., 1966). Dabei findet man zwei verschiedene Arten der Bindung von Substraten (REMMER et al., 1966; SCHENKMAN et al., 1967; IMAI und SATO, 1966):

Typ I-Substrate führen im Differenzspektrum zu Typ I-Spektren mit einem Absorptionsmaximum bei 390 nm und einem Minimum bei 420-425 nm; der Prototyp dieser Gruppe ist das Hexobarbital. Typ II-Substrate bilden Typ II-Spektren aus mit einem Maximum bei 425-430 nm und einem Minimum bei 390-405 nm. Diese Gruppe scheint auf einige

N-haltige aromatische Amine beschränkt zu sein; ihr Prototyp ist das Anilin. Typ I-Substrate scheinen vergleichsweise lipophiler zu sein als Typ II-Substrate (SCHENKMAN et al., 1967; ULLRICH, 1969). Im Absolutspektrum von Cytochrom P-450 zeigt sich bei der Zugabe von Typ I-Substraten eine Verschiebung des Peaks bei 420 nm zum kurzwelligen Bereich hin, bei Typ II-Substraten zum langwelligen Bereich. Stellt man die Differenzen der Spektren vor und nach Substratzugabe graphisch dar, ergeben sich nahezu die oben beschriebenen Differenzspektren (REMMER et al., 1969). Die Substratbindung an das Cytochrom P-450 ist ohne wesentliche Veränderung reversibel, wie durch Entfernung des Substrats durch Zentrifugation nachgewiesen wurde. Dabei stellen sich die ursprünglichen spektralen Eigenschaften des Cytochrom P-450 wieder ein (SCHENKMAN et al., 1967).

Aus der Größe der spektralen Veränderungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen läßt sich, entsprechend der Michaeliskonstanten K_m bei enzymatischen Reaktionen, eine spektrale Dissoziationskonstante K_s bestimmen, die ein Maß für die Affinität eines Substrates zum Cytochrom P-450 darstellt (REMMER et al., 1966).

Typ I-Substrate und Typ II-Substrate werden an verschiedenen Stellen des Cytochrom P-450 gebunden. Die Ausbildung von Typ I-Spektren hängt vom Lipoproteingehalt des Cytochroms ab (SCHENKMAN und SATO, 1968). Dafür spricht, daß nach Steapsinbehandlung der Mikrosomen die Ausbildung von Typ I-Spektren vermindert ist (SHOEMAN et al., 1969) und mit isooktanextrahierten Mikrosomen keine Typ I-Spektren zu erzielen sind (LEIBMAN und ESTABROOK, 1971).

Typ II-Substrate dagegen scheinen an das Eisen des Hämmoleküls gebunden zu werden, möglicherweise an derselben Stelle wie O_2 und CO (SCHENKMAN et al., 1967). Typ II-Substrate führen zu einer Verlangsamung der Reduktionsgeschwindigkeit von Cytochrom P-450, während Typ I-Substrate die Reduktionsgeschwindigkeit erhöhen (GIGON et al.,

1969). Ebenso wird die NADPH-Oxydation durch Typ I-Substrate gesteigert, durch Typ II-Substrate dagegen kaum beeinflusst oder gehemmt (GILLETTE, 1969; GIGON et al., 1969), während die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase durch beide Typen nicht tangiert wird (SASAME und GILLETTE, 1969).

Typ II-Substrate hemmen kompetitiv die Bindung von Typ I-Substraten an das Cytochrom P-450 (LEIBMAN et al., 1969) und den Metabolismus von Typ I-Substraten (SASAME und GILLETTE, 1970). Typ I-Substrate dagegen erhöhen das Bindungsvermögen für Typ II-Substrate. Die Bindung von Typ II-Substraten wird durch andere Typ II-Substrate unkompetitiv gehemmt; zur gegenseitigen Beeinflussung von Typ I-Substraten sind die Befunde uneinheitlich (LEIBMAN et al., 1969).

Die Gemeinsamkeit der Abbauege einer großen Zahl von verschiedenen Stoffen bewirkt, daß diese Stoffe sich gegenseitig in ihrem Abbau beeinflussen können. Hier sind zwei Mechanismen möglich: einmal eine Hemmung des Stoffwechsels durch alternative Substrate, die in eine Konkurrenz um die Bindung am Cytochrom P-450 eintreten (RUBIN et al., 1964), andererseits eine Induktion der einzelnen Komponenten des Enzymsystems.

Schon 1954 beobachteten BROWN et al. eine Stimulation von Enzymaktivitäten durch Fremdstoffe. CONNEY et al. (1956; 1957) fanden eine vermehrte Enzymsynthese nach Gabe von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, und REMMER beschrieb 1959 das Phenobarbital als Induktor der Fremdstoffhydroxylasen. Seitdem sind über 200 Substanzen bekannt geworden, die die mikrosomalen Enzymsysteme induzieren können (CONNEY, 1967). Das anatomische Korrelat der Induktion ist eine Proliferation des endoplasmatischen Retikulums (REMMER und MERKER, 1963), vornehmlich des "smooth"-Anteils (FOUTS und ROGERS, 1965), das chemische Korrelat eine Zunahme von Protein, RNA, Phospholipiden und Cholesterin in den Mikrosomen (GLAUMANN, 1970). Durch

die Induktion steigt der Gehalt an Cytochrom P-450 (REMMER, 1969; KAMIN et al., 1965) und NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (KAMIN et al., 1965; ORRENIUS und ERNSTER, 1964; ERNSTER und ORRENIUS, 1965; JICK und SHUSTER, 1966). Die Affinität der Enzyme zum Substrat wird nicht erhöht (RUBIN et al., 1964; NETTER und SEIDEL, 1964), jedoch nimmt möglicherweise die maximale Umsatzgeschwindigkeit zu (NETTER und SEIDEL, 1964).

Man unterscheidet zwei Gruppen von Induktoren, deren Prototypen das Phenobarbital und das 3-Methylcholanthren sind. Unterschiede in den Mikrosomen von phenobarbital- und 3-methylcholanthren-vorbehandelten Tieren, z.B. im Substratbindungsverhalten (SHOEMAN et al., 1969; SCHENKMAN et al., 1969; REMMER et al., 1969; HILDEBRANDT et al., 1968) und im Spektrum des Cytochrom P-450-CO-Komplexes (SLADEK und MANNERING, 1966; HILDEBRANDT et al., 1968; ALVAREZ et al., 1968; GNOSSPELIUS et al., 1969/70), führten zur Annahme zweier verschiedener Formen des Cytochrom P-450 (BIDLEMAN und MANNERING, 1970).

2. Der mikrosomale reduktive Arzneimittelstoffwechsel

Nicht nur die Enzyme des oxydativen Fremdstoffumbaus sind induzierbar, sondern auch die des reduktiven Stoffwechsels. Reduktive Abbauege in der Leber sind im Vergleich zum oxydativen Metabolismus noch wenig untersucht. Im Cytoplasma von Leber- und Nierenzellen findet sich eine Aldehyd- und Ketoreduktase (CULP und McMAHON, 1965). Auch Azo- und Nitrogruppen werden in der Leber reduziert (MUELLER und MILLER, 1950; FOUTS und BRODIE, 1957). Die hierfür erforderlichen Enzyme sind hauptsächlich in den Mikrosomen lokalisiert (FOUTS, 1961); eine Nitroreduktase findet sich aber auch im mikrosomenfreien Überstand (KATO et al., 1969). Die mikrosomale Azoreduktase ist durch Phenobarbital (CONNEY, 1967) und 3-Methylcholanthren (MAZEL und HERNANDEZ, 1967) induzierbar, die Nitroreduktase durch

Phenobarbital (CARLSON und DuBOIS, 1970). Beide Reduktasen haben Beziehungen zum oxydativen Stoffwechsel (Nitro: GILLETTE et al., 1968; SASAME und GILLETTE, 1969. Azo: HERNANDEZ et al., 1967), wohl in der Art, daß der Wasserstoff zur Reduktion über die Cytochrom P-450-Reduktase bereitgestellt wird. Für diese Beziehung sprechen auch Befunde, die eine Interaktion zwischen Substraten des oxydativen und des reduktiven Stoffwechsels zeigen. So fanden SASAME und GILLETTE (1969) durch Typ I-Substrate eine Stimulierung und durch Typ II-Substrate eine Hemmung der Nitroreduktase.

Eine Substanz, die reduktiv abgebaut wird und große Bedeutung bei der Erforschung des Arzneimittelstoffwechsels gewonnen hat, ist das Metyrapon (2-Methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon). Es wurde als Hemmstoff der C_{11} -Steroid-Hydroxylase in der Nebennierenrinde gefunden (LIDDLE et al., 1958; JENKINS et al., 1959), hemmt aber auch die C_{18} -Hydroxylierung (KRAULIS und BIRKINGHAM, 1963; ERICKSON et al., 1966) und die C_{19} -Hydroxylierung (SANZARI und PERON, 1966). In der Klinik wird Metyrapon (Metopiron^R) zur Testung des Rückkopplungsmechanismus zwischen NNR und HVL angewendet (LIDDLE et al., 1959). Auch auf den oxydativen Arzneimittelstoffwechsel in Lebermikrosomen hat Metyrapon eine inhibitorische Wirkung (LEIBMAN, 1966; NETTER et al., 1967). Dabei fällt auf, daß der Stoffwechsel einiger Typ II-Substrate durch Metyrapon in kleinen Dosen beschleunigt und erst in höheren Dosen gehemmt wird (LEIBMAN, 1969; MINCK et al., 1972). Dies wurde mit der Existenz zweier Formen des Cytochrom P-450 in Zusammenhang gebracht (HILDEBRANDT et al., 1969), jedoch ist der Mechanismus dieses Aktivierungseffektes im einzelnen noch nicht aufgeklärt.

Metyrapon wird in der Art eines Typ II-Substrates an Cytochrom P-450 gebunden (NETTER et al., 1969). Anders als die anderen bekannten Substrate bildet es auch in dithionitreduzierten Mikrosomen ein Differenzspektrum aus, mit einem Absorptionsmaximum bei 446 nm (HILDEBRANDT et al., 1969), und hemmt kompetitiv die Bindung von CO an

Cytochrom P-450 (IMAI und SATO, 1967). Trotz der Bindung an Cytochrom P-450 wird Metyrapon nicht als Substrat des mikrosomalen arzneimittelhydroxylierenden Enzymsystems angesehen (KAHL und NETTER, 1970); oxydierte Stoffwechselprodukte wurden bisher nicht nachgewiesen.

Der Hauptmetabolit des Metyrapons ist vielmehr ein an der aliphatischen Ketogruppe reduziertes Produkt, das im menschlichen Urin (SPRUNT et al., 1967) und in verschiedenen tierischen Geweben (KRAULIS et al., 1968) nachgewiesen wurde. KAHL (1970a) untersuchte den Stoffwechsel von Metyrapon in Rattenlebern und fand, daß die metyraponreduzierende Aktivität hauptsächlich in der Mikrosomenfraktion lokalisiert ist. Im 105000 x g - Überstand findet sich nur eine geringe Aktivität. Als Cofaktor ist NADPH notwendig. Durch Phenobarbital ist die mikrosomale Metyraponreduktase nicht induzierbar (KAHL, 1970b). Ein weiterer, bisher nicht identifizierter Metabolit des Metyrapons wird im 105000 x g - Überstand gebildet (DÜNGES und KAHL, 1970). Er läßt sich chromatographisch von Metyrapon und reduziertem Metyrapon trennen und zeigt im UV-Spektrum ein Absorptionsmaximum bei 285 nm, im Gegensatz zu Metyrapon und reduziertem Metyrapon, die beide ein Maximum bei 260 nm aufweisen. Auch seine Bildung ist NADPH-abhängig. In Anoxie wird der Metabolit besser gebildet als unter aeroben Bedingungen, was darauf schließen läßt, daß es sich auch hier nicht um ein oxydiertes Produkt handelt.

3. Beziehungen zwischen Steroid- und Arzneimittelstoffwechsel

Schon 1934 demonstrierte ZONDEK, daß Östrogene in der Leber abgebaut werden. Später fanden sich hauptsächlich zwei Abbauewege von Steroiden in der Säugetierleber: einmal die Sättigung des ungesättigten Rings A, zum anderen Hydroxylierungen an verschiedenen Positionen des Sterangerüsts.

Die Reduktion des Rings A findet sich bei Steroiden aller Gruppen, wie Androgenen (SAMUELS et al., 1947), Gestagenen (WISWELL und SAMUELS, 1953) und Corticosteroiden (SCHNEIDER und HORSTMANN, 1951). In der Rattenleber sind die Δ^4 -3-Ketosteroidreduktasen spezifisch für verschiedene Steroidsubstrate (McGUIRE und TOMKINS, 1960). 5 α -Steroid-Ring-Reduktasen sind in der mikrosomalen, 5 β -Reduktasen in der löslichen Fraktion der Leberzellen lokalisiert (TOMKINS, 1957; McGUIRE et al., 1960). Mikrosomen weiblicher Ratten hydrieren den Ring A schneller als die männlicher Ratten (LEYBOLD und STAUDINGER, 1959). 5 α - und 5 β -Reduktion sind NADPH-abhängig (McGUIRE und TOMKINS, 1959; URQUHART et al., 1959). Die mikrosomale 5 α -Reduktion ist phenobarbitalstimulierbar, jedoch nicht CO-hemmbar, was eine Beteiligung des Cytochrom P-450 an der Reaktion unwahrscheinlich macht (v. BAHR et al., 1969). Durch Phenylbutazon (KERSTEN und STAUDINGER, 1956; KORUS et al., 1956), Imipramin und Östrogene (LEYBOLD und STAUDINGER, 1961) sowie Heparin (BIGGS et al., 1967) ist die Steroid-Ring A-Reduktion hemmbar.

Auch der oxydative Abbau von Steroiden findet in den Lebermikrosomen statt. Desoxycorticosteron wird in 6 β -Stellung hydroxyliert (AXELROD und MILLER, 1954), Östradiol-17 β wird zu 6 α -, 6 β -, 16 α - und 2-Hydroxy-Derivaten metabolisiert (MUELLER und RUMNEY, 1957; BREUER et al., 1962; PANGELS und BREUER, 1962), Testosteron zu 6 β -, 16 α -, 2 β - und 7 α -Hydroxytestosteron (CONNEY und KLUTCH, 1963; LISBOA et al., 1968). Auch Dihydroxy- (GUSTAFSSON et al., 1968a) und Trihydroxyderivate (ABRAHAM und STAUDINGER, 1966; GUSTAFSSON et al., 1968b) werden gebildet. Progesteron wird von Rattenleberhomogenaten in 16-Stellung hydroxyliert (WETTSTEIN et al., 1959).

1964 fanden KUNTZMAN et al. starke Ähnlichkeiten zwischen dem steroidhydroxylierenden und dem arzneimitteloxydierenden Enzymsystem: Beide sind in den Mikrosomen lokalisiert und benötigen NADPH und Sauerstoff; beide zeigen

eine höhere Aktivität in Ratten als in Mäusen und eine höhere Aktivität in männlichen gegenüber weiblichen Ratten, während sich bei Mäusen kein Geschlechtsunterschied findet; beide werden in vitro durch SKF 525-A gehemmt. Aus diesen Ähnlichkeiten zogen KUNTZMAN et al. (1964) den Schluß, daß die Steroide die natürlichen Substrate des arzneimitteloxydierenden Enzymsystems seien. Dies wurde noch dadurch bestätigt, daß die Steroidhydroxylasen durch CO hemmbar sind (CONNEY et al., 1968).

Die Gemeinsamkeit der Abbauege läßt eine gegenseitige Beeinflussung von Steroid- und Arzneimittelstoffwechsel erwarten. Tatsächlich hemmen Insektizide in vitro die mikrosomale Testosteronhydroxylierung (WEICH et al., 1967). Eine Induktion steroidhydroxylierender Aktivitäten und eine entsprechende Verminderung der biologischen Wirkung einer Reihe von Steroidhormonen wurde tierexperimentell für verschiedene Substanzen nachgewiesen, wie Phenobarbital (CONNEY et al., 1966; LEVIN et al., 1968; WEICH et al., 1968), Pentobarbital (HAGINO et al., 1966), Phenylbutazon (CONNEY und SCHNEIDMAN, 1964) und Insektizide (KUNTZMAN et al., 1965; CONNEY et al., 1966; WEICH et al., 1967). Auch beim Menschen ist eine Stimulierung von Hydroxylierungsreaktionen am Steroidgerüst durch langdauernde Einnahme von Medikamenten beschrieben. So wird Cortisol durch Diphenylhydantoin (WERK et al., 1964), Phenylbutazon (KUNTZMAN et al., 1966), Phetharbital (SOUTHERN et al., 1969), Phenobarbital und o,p'-DDP (BURSTEIN und KLAIBER, 1965) vermehrt in 6 β -Stellung hydroxyliert. Stark polare Metabolite von Testosteron werden nach Phetharbitalbehandlung vermehrt im Urin ausgeschieden (SOUTHERN et al., 1969). Die Östradiolhydroxylierung an C₆ und C₇ wird durch Barbiturate, Cyclophosphamid und Sulfadimethoxin stimuliert (WENZEL und STAHL, 1970).

Andererseits können auch Steroide die Abbaugeschwindigkeit anderer Arzneimittel beeinflussen. So wird bei der

Ratte durch längere Cortisonvorbehandlung die Oxydation von Hexobarbital und Pethidin beschleunigt (REMMER, 1958). SELYE (1970b) fand in einer Studie mit 304 natürlichen und synthetischen Steroiden eine Reihe von Substanzen, die die Toxizität von Indomethazin und Digitoxin in der Ratte senken. Für einige Beispiele ist nachgewiesen, daß dieser "katatoxische" (SELYE, 1970a) Effekt auf einer Induktion mikrosomaler Enzyme beruht (SOLYMOSS et al., 1969; SOMOGYI et al., 1971). FAHIM und HALL (1970) zeigten in weiblichen Ratten eine Erhöhung der Demethylierungsrate nach Progesteronvorbehandlung, bei männlichen Ratten jedoch eine Erniedrigung. JUCHAU und FOUTS (1966) fanden dagegen keinen Effekt einer Progesteronvorbehandlung auf die Hexobarbital- und Zoxazolaminhydroxylierung in männlichen Rattenleberhomogenaten. Nach Östradiol-17 β -Behandlung zeigt sich bei beiden Geschlechtern eine Hemmung der Demethylierung in der Leber (FAHIM et al., 1971). In vitro werden die Äthylmorphin- und Hexobarbitaloxydation sowie der Chlorpromazinmetabolismus in Mikrosomen männlicher Ratten durch Östradiol-17 β , Progesteron, Testosteron, Androsteron und Hydrocortison gehemmt (TEPHLY und MANNERING, 1968). Außer Progesteron bewirken auch verschiedene seiner Metabolite eine Hemmung der Anilinhydroxylierung und p-Nitroanisol-Demethylierung (SOYKA und LONG, 1972). Eine Beeinflussung des reduktiven Stoffwechsels in Mikrosomen durch Steroide wurde noch nicht beschrieben. Die Nitro- und Azoreduktase werden in vitro durch Progesteron nicht gehemmt (JUCHAU und FOUTS, 1966).

Da immer mehr Frauen hormonale Kontrazeptiva benutzen, verdient die Frage nach Wechselwirkungen von Arzneimitteln und den Bestandteilen der "Pille" verstärktes Interesse. Einige synthetische Steroide, die in Ovulationshemmern verwendet werden, wie Äthinylöstradiol, Mestranol, Norethynodrel und Norethisteron, verlieren in der Ratte nach Vorbehandlung mit Phenobarbital ihre

uterotrope Wirkung durch Beschleunigung ihres Stoffwechsels (LEVIN, 1968). Für eine Beeinträchtigung der Kontrazeptiva beim Menschen durch gleichzeitige Behandlung mit anderen Arzneimitteln, z.B. Rifampicin, gibt es einige Hinweise (NOCKE-FINCK et al., 1973). Ähnlich verhält es sich mit der Wirkung von Kontrazeptiva auf den Stoffwechsel anderer Arzneimittel. Bei Frauen, die Ovulationshemmer verschiedener Zusammensetzung einnahmen, wurde eine Hemmung des Abbaus von Promazin und Pethidin (CRAWFORD und RUDOFSKI, 1966) und eine Verlängerung der Halbwertszeit von Antipyrin (O'MALLEY et al., 1970; 1972) beschrieben.

LEE und CHEN (1971) untersuchten tierexperimentell die in Kontrazeptiva verwendeten Östrogene, Äthinylöstradiol und Mestranol. Diese hemmen in vitro die p-Nitroanisol-Demethylierung in Rattenlebermikrosomen. Vorbehandlung von weiblichen Ratten mit Mestranol zeigte keine Induktion der mikrosomalen Enzyme; mit Äthinylöstradiol wurde sogar eine Abnahme der Amidopyrindemethylierung, der Anilinhydroxylierung und des Cytochrom P-450-Gehalts erzielt. Bei Mäusen sind nach Mestranolvorbehandlung die Schlafzeit nach Barbituraten (BLACKHAM und SPENCER, 1969) und der Effekt von Antikonvulsiva (BLACKHAM und SPENCER, 1970) verlängert.

Auch für einige der in Kontrazeptiva verwendeten synthetischen Gestagene liegen tierexperimentelle Befunde vor. Nach Lynestrenolbehandlung werden in der Maus Phenobarbital und Diphenylhydantoin vermehrt eliminiert (RÜMKE und NOORDHOEK, 1969) und die Pentobarbital- und Hexobarbitalschlafzeit (BLACKHAM und SPENCER, 1969) sowie die antikonvulsive Wirkung von Diphenylhydantoin, Phenobarbital, Chlordiazepoxid und Diazepam (BLACKHAM und SPENCER, 1970) verlängert. Bei der Ratte führt Vorbehandlung mit Medroxyprogesteronacetat zu einer Verkürzung der Pentobarbitalschlafzeit und einer Beschleunigung des in vitro-Abbaus von p-Nitroanisol, Anilin und Ami-

dopyrin in Mikrosomen (JORI et al., 1969). Die chronische Verabreichung von Norethynodrel stimuliert den mikrosomalen Abbau von Hexobarbital und Zoxazolamin (JUCHAU und FOUTS, 1966). Akute Behandlung mit Norethynodrel verlängert die Pentobarbitalschlafzeit bei Ratten (JORI et al., 1969). In vitro hemmt Norethynodrel ebenso wie Progesteron den oxydativen Metabolismus von Hexobarbital, Zoxazolamin und Anilin (JUCHAU und FOUTS, 1966).

4. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Hemmbarkeit des oxydativen Arzneimittelstoffwechsels in Rattenlebermikrosomen durch Gestagenbestandteile hormonaler Kontrazeptiva (Lynestrenol, d-Norgestrel, Norethisteronacetat) und das Gestagen Allylestrenol vorgelegt.

Es soll geklärt werden, ob diese Steroide in der Art von Substraten an Cytochrom P-450 gebunden werden. Die spektralen Dissoziationskonstanten K_s werden bestimmt. An den Modellreaktionen der p-Nitroanisoldemethylierung und der Anilinhydroxylierung soll die inhibitorische Wirkung der vier Gestagene in vitro untersucht werden. Die inhibitorische Wirkung wird an Hand von Inhibitorkonstanten quantifiziert.

Da Steroide in den Mikrosomen sowohl oxydativ als auch reduktiv abgebaut werden, ist mit einem Einfluß der Steroide auch auf den reduktiven Arzneimittelstoffwechsel zu rechnen. Um die Prüfung dieses Problems vorzubereiten, wurde eine Versuchsanordnung zur Untersuchung der Metyraponreduktion aufgebaut. Dieser reduktive Abbauweg wurde gewählt, weil er eine Reihe von Ähnlichkeiten mit der Steroid-Ring A-Reduktion aufweist. Beim Aufbau der Versuchsanordnung ergaben sich unerwartet Hinweise dafür, daß Metyrapon in den Mikrosomen nicht nur reduktiv, son-

dern auch oxydativ abgebaut wird. Da ein solcher Ab-
bauweg von Bedeutung für die Interpretation des Hemm-
mechanismus von Metyrapon beim Arzneimittelstoffwech-
sel sein kann, soll zunächst dieser Befund ausgearbei-
tet werden. Dabei sollen insbesondere die Bedingungen
des oxydativen Metyraponstoffwechsels und seine Indu-
zierbarkeit durch Phenobarbital untersucht werden.

M E T H O D E N

1. Vorbehandlung der Tiere und Mikrosomenpräparation

Männliche Sprague-Dawley-Ratten von 150 - 180 g Körpergewicht erhielten drei Tage lang intraperitoneal je 80 mg Phenobarbital/kg Körpergewicht, gelöst in 0,4 - 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung. Kontrolltiere für Stimulierungsversuche erhielten die gleiche Menge Kochsalzlösung. Wasser und Altromin^R-Trockenfutter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die letzte Phenobarbitalinjektion erfolgte 20 - 24 Stunden vor der Tötung der Tiere. 12 Stunden vor der Tötung wurde den Tieren das Futter entzogen.

Die Ratten wurden durch Brechen des Genicks getötet. Die Halsvenen wurden durchtrennt, um die Tiere gut ausbluten zu lassen. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde ein Katheter in die Pfortader geschoben, die Vena cava caudalis durchschnitten und die Leber bis zur Blutleere mit eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung perfundiert. Die Lebern wurden entnommen und anschließend mit zwei Volumina einer Saccharose-Versen-Tris-(SVT-)Lösung homogenisiert. Diese Lösung enthielt Saccharose 0,25 M, Na-EDTA (Versen) 0,005 M und Trishydroxyaminomethan 0,02 M (LEYBOLD und STAUDINGER, 1959); mit 1 N HCl war ein pH-Wert von 7,4 eingestellt worden. Das Homogenat wurde in einer Sorvall-Zentrifuge 15 min. bei 1600 x g und danach 30 min. bei 9000 x g zentrifugiert. Der 9000 x g - Überstand wurde anschließend in einer Spinco-Ultrazentrifuge (L265B-Beckman) 60 min. bei 105000 x g zentrifugiert. Die sedimentierte Mikrosomenfraktion wurde einmal mit SVT-Lösung gewaschen. Der resedimentierte Niederschlag wurde bis zur Pipettierbarkeit verdünnt, in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert und anschließend in Portionen von 2 ml bei -20°C aufbewahrt. Die gesamte Mikrosomenpräparation erfolgte bei Temperaturen von 0° - 4°C. Der Eiweißgehalt

der Fraktionen wurde nach LOWRY et al. (1951) bestimmt. Als Standard diente Labtrol^R.

Vor der Verwendung wurden die Fraktionen langsam in Eiswasser aufgetaut. Alle Versuchsreihen wurden mit Mikrosomen durchgeführt, die verschiedenen Präparationen entstammten.

2. Spektralanalytische Untersuchungen

Für die Untersuchungen zur Bindung der Gestagene an das Cytochrom P-450 wurden im registrierenden Doppelwellenlängen-Spektralphotometer Aminco-Chance bei einer Temperatur von 30°C im Split-beam-Verfahren Differenzspektren aufgenommen. Ein Doppelansatz Mikrosomensuspension in 0,067 M Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7,4 wurde in die Proben- und Referenzküvette aufgeteilt (je 2,5 ml). Die Suspension enthielt 1 mg Protein/ml. Anschließend wurde eine Basislinie gleicher Absorption in einem Wellenlängenbereich von 350 nm bis 500 nm errichtet. Nun erfolgte sukzessiv, in genormten zeitlichen Abständen, die Zugabe des jeweiligen Gestagens, gelöst in Dimethylformamid, in die Probenküvette. Die Zugabevolumina betrugen 2 - 10 µl. In die Referenzküvette wurde die gleiche Menge Lösungsmittel eingebracht, um Verdünnungs- oder Röhreffekte auszuschließen. Nach Umrühren mit einem Glasstäbchen wurde für jede Konzentration das Spektrum aufgezeichnet. Die auf das Volumen in der Küvette berechneten Gestagenkonzentrationen betrugen $10^{-5}M$, $2 \times 10^{-5}M$, $4 \times 10^{-5}M$ und $10^{-4}M$. Die Gegenwart von Dimethylformamid in den Mikrosomen der Probenküvette ergab in den verwendeten Mengen kein Differenzspektrum im Meßbereich. Eine Eigenabsorption des Dimethylformamid sowie der geprüften Gestagene in diesem Bereich wurde ausgeschlossen.

Sollte die Bindung der Substanzen an reduziertes Cytochrom P-450 untersucht werden, wurden der Mikrosomensuspension vor der Aufteilung in die Küvetten 1 mg Natrium-dithionit/ml Suspension zugegeben.

Um auszuschließen, daß die spektralen Veränderungen durch die Gestagene nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lösungsmittel entstehen, wurde folgender Kontrollversuch durchgeführt: Als Probenküvette diente eine Thunberg-Küvette. Nach Errichtung der Basislinie wurden die in Dimethylformamid gelösten Gestagene in den Aufsatz der Küvette vorgelegt, das Lösungsmittel unter Stickstoff verdampft, der Aufsatz der Küvette aufgesetzt und das System einige Male geschüttelt. Die Referenzküvette wurde in gleicher Weise ohne Substrat geschüttelt. Anschließend wurden die Spektren aufgezeichnet. Bei diesen Versuchen wurden die gleichen Ergebnisse erzielt wie beim oben beschriebenen Vorgehen.

3. Versuche zur Hemmwirkung von Gestagenen auf den Arzneimittelstoffwechsel

a. Inkubationssystem

Die Versuche zum mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsel wurden in einem Wasserbad bei maximaler Schüttelfrequenz durchgeführt. Das Inkubationssystem enthielt in einem Volumen von 2,5 ml 15 μMol Glucose-6-Phosphat und 1,4 Einheiten Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase als NADPH-regenerierendes System, 0,9 μMol NADP und 2,5 mg mikrosomales Protein in 0,067 M Sörensen-Phosphat-Puffer. Nach 5 min. Vorinkubation wurden die Reaktionen durch Substratzugabe gestartet. Der pH-Wert betrug 7,8, die Temperatur 30°C. Gestoppt wurden die Reaktionen durch Zugabe von Trichloressigsäure 20 %. Grundsätzlich wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

b. p-Nitroanisol-Demethylierung

Bei der oxydativen Demethylierung von p-Nitroanisol (pNA) entsteht p-Nitrophenol (pNP), eine im Alkalischen gelb gefärbte Substanz (NETTER und SEIDEL, 1964). Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen (LIER 1972).

Eine Eichkurve von pNP wurde bis zu einer Konzentration von 10^{-4}M erstellt. Sie verlief linear. Die bei den Hemmversuchen verwendeten pNA-Konzentrationen waren $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ und 10^{-4}M . Die Inkubationszeit nach dem Starten der Reaktion mit 0,2 ml pNA-Lösung betrug 2 min. Während dieser Zeit war die Zeitumsatzkurve linear. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 0,5 ml 20 %iger Trichloressigsäure wurden die Ansätze zentrifugiert, 2 ml des klaren Überstands mit 0,15 ml 4 N NaOH alkalisiert, und die Absorption bei 405 nm in einem Eppendorf-Photometer gemessen. Die Menge des entstandenen pNP wurde mit Hilfe der Standardeichkurve ermittelt.

c. Anilinhydroxylierung

Bei der p-Hydroxylierung von Anilin entsteht p-Aminophenol (pAP). Diese Substanz kann nach Kopplung mit Phenol als blauer Indophenol-Farbstoff quantifiziert werden (BRODIE und AXELROD, 1948). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Modifikation dieser Methode von IMAI et al. (1966) verwendet, bei der auf die Ätherextraktion verzichtet wird.

Die Eichkurve von pAP war im geprüften Bereich linear. Die verwendeten Anilinkonzentrationen waren $1,25 \times 10^{-4}\text{M}$, $2,5 \times 10^{-4}\text{M}$ und $5 \times 10^{-4}\text{M}$. Die Inkubationszeit nach dem Starten der Reaktion mit 0,1 ml Anilininlösung betrug 20 min. Während dieser Zeit war die Zeitumsatzkurve linear. Gestoppt wurde die Reaktion mit 1,25 ml 20 %iger Trichloressigsäure; anschließend wurde zentrifugiert und 1 ml klarer Überstand mit 1 ml 10 %igem Na_2CO_3 und 1 ml Phenolreagenz (1 %iges Phenol in 0,5 N NaOH) zusammengebracht. Nach 30 min. wurde die Absorption bei 623 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Die Menge des entstandenen pAP wurde mit Hilfe von internen Standardwerten ermittelt.

d. Gestagenzugabe zum Inkubationssystem

Die verwendeten Gestagene erwiesen sich als schwer in Wasser löslich, zur Lösung mußten organische Lösungsmittel verwendet werden. In orientierenden Versuchen wurde zunächst der Eigeneffekt einiger Lösungsmittel auf die spektralen Veränderungen durch ihre Bindung an das Cytochrom P-450 und ihr Einfluß auf die pNA-Demethylierung und die Anilinhydroxylierung untersucht. Zur Messung wurden die oben angegebenen Methoden verwendet. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle:

Lösungsmittel	Differenzspektrum	pNA-Umsatz	Anilinumsatz
Aceton	50 µl Zugabe kein Spektrum	5 µl Zugabe 10% Hemmung	5 µl Zugabe 50% Aktivierung
Methanol	50 µl Zugabe Typ II-Spektrum	5 µl Zugabe 10% Hemmung	nicht geprüft
Dimethylform- amid	50 µl Zugabe kein Spektrum	2 µl Zugabe 10% Hemmung	2 µl Zugabe 10% Hemmung
Dioxan	nicht geprüft	10 µl Zugabe 70% Hemmung	nicht geprüft

Da alle getesteten Lösungsmittel schon bei kleinsten Zugabevolumina einen Eigeneffekt auf die Modellreaktionen hatten, wurde folgendes Vorgehen zur Applikation der Gestagene bei den Hemmversuchen gewählt: Die Gestagene wurden in Dimethylformamid gelöst und in Volumina von 2 µl - 10 µl in die Inkubationsgefäße vorgelegt. Das Lösungsmittel wurde vorsichtig unter Stickstoff verdampft. Anschließend wurden die übrigen Bestandteile des Inkubationssystems zugegeben und nach 5 min. Vorinkubation die Reaktionen gestartet. Eine Zunahme der Wirkung der Gestagene durch eine längere Vorinkubation wurde nicht gefunden.

Geprüft wurden bei der pNA-Demethylierung die Wirkung von Steroidkonzentrationen von $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ bis 10^{-4} M und bei der Anilinhydroxylierung die Wirkung von Steroidkon-

zentrationen von 10^{-5}M bis $5 \times 10^{-4}\text{M}$. Diese Konzentrationsangaben gelten unter der Annahme der vollständigen Lösung der Substanzen.

4. Untersuchungen zum mikrosomalen Metyraponstoffwechsel

a. Inkubationssystem

Die Untersuchung des Metyraponstoffwechsels erfolgte in Anlehnung an KAHL (1970).

Die Inkubationstemperatur betrug 30°C , der pH-Wert 7,4. Das Inkubationssystem enthielt dieselben Bestandteile wie bei den Hemmversuchen zur pNA-Demethylierung und zur Anilinhydroxylierung (unter 3a beschrieben). Die Inkubationszeit betrug in der Regel 1 Stunde. Während dieser Zeit war die Zeitumsatzkurve der Metyraponreduktion annähernd linear. Die Metyraponkonzentration betrug immer 10^{-3}M , die Konzentration von reduziertem Metyrapon $2 \times 10^{-4}\text{M}$. Gestartet wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0,2 ml Substratlösung. Am Ende der Inkubationsperiode wurde 0,5 g NaCl zugegeben und mit 0,2 M Trislösung ein pH-Wert von 9 eingestellt.

Um die enzymatische Entstehungsweise der Metabolite nachzuweisen, wurden Ansätze inkubiert, die das gesamte Inkubationssystem ohne Mikrosomen oder mit zuvor 10 min. auf 80°C erhitzten Mikrosomen enthielten.

b. Prüfung der Sauerstoffabhängigkeit des Metyrapon-metabolismus

Sollten die Umsätze unter aeroben Bedingungen untersucht werden, wurde im Köttermann-Wasserbad bei maximaler Schüttelfrequenz inkubiert. Die Versuche unter anoxischen Bedingungen wurden in einem geschlossenen Gefäß durchgeführt. Dabei wurde der O_2 -Partialdruck im Inkubationsgefäß kontinuierlich mit einer Mehrdrahtelektrode (Fa. Eschweiler und Co., Kiel) polarographisch gemessen und aufgezeichnet. Die Elektrode war zuvor mit Stickstoff

auf 0 Torr und mit Luft auf 150 Torr bei der Inkubationstemperatur von 30°C geeicht worden. Das Inkubationsmedium (ohne Substrat und NADP) wurde in das Gefäß gebracht und durch einen Magnetrührer in Bewegung gehalten. Anschließend wurde NADP zugegeben. Darauf fiel der O₂-Partialdruck ab, bis nach ca. 15 min. Anoxie erreicht war. Jetzt wurde das Substrat zugegeben. Der O₂-Partialdruck blieb während der Inkubationszeit auf 0 Torr. Als Kontrolle mit polarographisch gesicherten aeroben Verhältnissen diente ein Versuch, bei dem der verwendete Puffer zuvor 15 min. und das gesamte Inkubationssystem für 30 sec. mit O₂ begast worden waren. Außerdem wurde das Gefäß nicht verschlossen. Nach 15 min. Vorinkubation in Anwesenheit von NADP wurde mit Substrat gestartet. Der O₂-Partialdruck fiel in diesem Versuch während der einstündigen Inkubation auf ca. 90 Torr ab.

c. Trennung der Metabolite

Zur Extraktion der Metabolite wurden die Ansätze nach dem Stoppen der Reaktion für 15 min. mit 10 ml Chloroform mechanisch geschüttelt. Nach Phasentrennung durch 10-minütige Zentrifugation wurden 8 ml der Chloroformphase im Vakuumverdampfer zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 0,2 ml Methanol gelöst. 40 µl dieser Lösung wurden auf eine Kieselgel-F254-Fertigplatte der Firma E. Merck, Darmstadt, aufgetragen und aufsteigend in Methanol-Chloroform (20:80 oder 10:90, V/V) entwickelt. Die Laufhöhe betrug 15 cm. Zur Quantifizierung wurden die chromatographisch getrennten Substanzflecke unter einer UV-Lampe (254 nm) markiert, aus der Schicht ausgekratzt und in 3 ml Glycinpuffer (pH 1,3) eluiert. Nach Zentrifugation wurde die Absorption des klaren Überstands in einem Beckman-Spektralphotometer im UV-Bereich gegen den Leerwert gemessen. Die Differenz der Absorptionen bei 285 nm und 260 nm wurde bestimmt. Diese Differenz

war beim reduzierten Metyrapon im gemessenen Bereich der Konzentration proportional. Die Linearität der Eichkurven der anderen Metabolite, für die keine Bezugssubstanzen zur Verfügung standen, wurde durch Verdünnungsreihen gesichert.

5. Materialien

Norethisteronacetat und d-Norgestrel wurden von der Fa.Schering AG, Berlin, Lynestrenol und Allylestrenol von der Fa.Organon, München, Metyrapon und reduziertes Metyrapon von der Fa.Ciba, Pharmaceutical Company, Summit, N.J., USA, zur Verfügung gestellt. Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und NADP stammen von der Fa.Boehringer, Mannheim, p-Aminophenol von der Fa. Riedel-deHaen AG, Seelze-Hannover, Labtrol^R von der Dade Reagents Inc., USA. Alle übrigen Reagentien wurden von der Fa.E.Merck, Darmstadt, bezogen.

6. Auswertung der Versuche

a. Spektrale Untersuchungen

Aus den direkt aufgezeichneten Differenzspektren wurde für jede Konzentration die Absorptionsdifferenz zwischen Absorptionsmaximum und -minimum unter Berücksichtigung der Baseline abgelesen. Die Kehrwerte dieser Differenzen wurden gegen die Kehrwerte der Substratkonzentrationen nach Art eines Lineweaver-Burk-Diagramms aufgetragen. Aus dem Schnittpunkt der errechneten Regressionsgeraden mit der Abszisse ergab sich die spektrale Dissoziationskonstante K_s . Aus den K_s -Werten, die mit drei verschiedenen Mikrosomenfraktionen gewonnen waren, wurde das arithmetische Mittel gebildet. Bei den angegebenen Streuungen handelt es sich um den Standardfehler des Mittelwerts ($s_{\bar{x}}$).

b. Versuche zur Hemmung des mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsels

Aus den von 3 - 5 verschiedenen Mikrosomenpräparationen für die jeweilige Hemmstoffkonzentration erhaltenen Meßwerten wurde das arithmetische Mittel $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts berechnet und in Säulendiagrammen dargestellt. Für jedes Gestagen wurde eine eigene Versuchsreihe durchgeführt. Auf statistisch bedeutsame Unterschiede zwischen den Werten einer jeden Versuchsreihe wurde nach dem Verfahren von KRUSKAL und WALLIS (1952) geprüft.

Die Ergebnisse jedes einzelnen Versuchs wurden in Dixon-Diagrammen dargestellt. Dabei wurden die Vkehrwerte der gemessenen Umsätze gegen die Hemmstoffkonzentrationen aufgetragen. Für die verschiedenen Substratkonzentrationen wurden Regressionsgeraden berechnet. Nur derjenige Konzentrationsbereich der Gestagene wurde für die Berechnung verwendet, in dem sich eine lineare Beziehung im Dixon-Diagramm ergab. Aus dem Schnittpunkt der Geraden wurde der Hemmtyp bestimmt und die Hemmkonstante K_i graphisch ermittelt. Das arithmetische Mittel der K_i , die aus Versuchen mit 3 - 5 verschiedenen Enzympräparationen gewonnen waren, wurde bestimmt. Auch hier handelt es sich bei der angegebenen Streuung um den Standardfehler des Mittelwerts.

ERGEBNISSE

1. Spektralanalytische Untersuchungen

Lynestrenol, Allylestrenol, Norethisteronacetat und d-Norgestrel werden unter aeroben Bedingungen in der Art von Typ I-Substraten an Cytochrom P-450 gebunden. Im Differenzspektrum bildet sich bei Zugabe dieser Substanzen ein Absorptionsmaximum bei 390 - 393 nm und ein Absorptionsminimum bei 420 - 423 nm aus. Bei Erhöhung der Substratkonzentration zeigt sich eine Größenzunahme von Maximum und Minimum, wie dies Abb.1 am Beispiel des Lynestrenol zeigt. Die Ergebnisse wurden in Lineweaver-Burk-Diagrammen dargestellt. Linearität in diesem Diagramm ergab sich bis zu einer Substratkonzentration von $10^{-4}M$. Für den linearen Bereich wurden die spektralen Dissoziationskonstanten K_s bestimmt. In Tab.1 sind die K_s -Werte der vier geprüften Substanzen zusammengestellt. Alle Werte liegen zwischen $10^{-5}M$ und $5 \times 10^{-5}M$.

Tab.1: Spektrale Dissoziationskonstanten K_s von synthetischen Gestagenen in Rattenlebermikrosomen unter aeroben Bedingungen.

	K_s (μM)
Lynestrenol	22 ± 2
Allylestrenol	17 ± 1
Norethisteronacetat	36 ± 10
d-Norgestrel	46 ± 7

Die Werte sind $\bar{X} \pm s_x$ von 3 verschiedenen Enzympräparationen.

Innerhalb dithionitreduzierter Mikrosomen zeigten sich im Differenzspektrum bei Zugabe der Gestagene keine Veränderungen. Dies läßt darauf schließen, daß die Substanzen an reduziertes Cytochrom P-450 nicht gebunden werden.

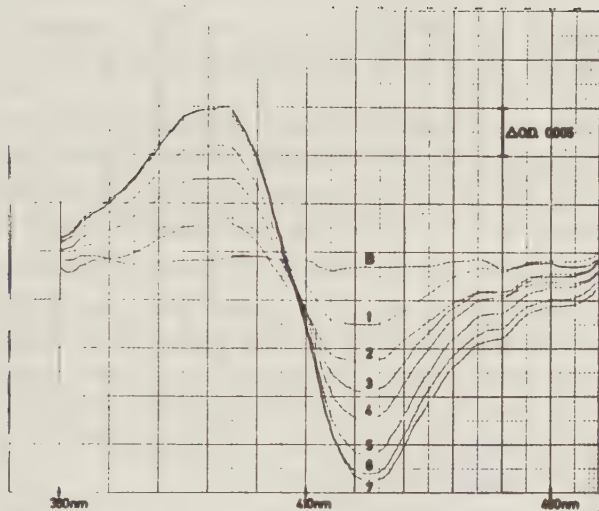


Abb.1 Differenzspektren von Lynestrenol in Rattenlebermikrosomen unter aeroben Bedingungen. (Eiweißgehalt 1 mg/ml, Temperatur 30°C, pH 7,4). B: Basislinie gleicher Absorption. 1-7: Kumulative Zugabe von Lynestrenol in 2-10 μ l Dimethylformamid. 1: $10^{-5}M$, 2: $2 \times 10^{-5}M$, 3: $5 \times 10^{-5}M$, 4: $10^{-4}M$, 5: $2 \times 10^{-4}M$, 6: $5 \times 10^{-4}M$, 7: $10^{-3}M$.

2. Hemmung der pNA-Demethylierung durch Gestagene

Die mikrosomale pNA-Demethylierung wird bei pNA-Konzentrationen von $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$ bis 10^{-4}M durch Lynestrenol, Allylestrenol, Norethisteronacetat und d-Norgestrel schon in einer Konzentration von $5 \times 10^{-6} \text{M}$ gehemmt. In Tab.2 sind die Ergebnisse der Hemmversuche zusammengestellt.

In Abb.2 ist das Ausmaß der Hemmung durch die vier Gestagene für die mittlere pNA-Konzentration von $5 \times 10^{-5} \text{M}$ dargestellt. Bei einer Gestagenkonzentration von $5 \times 10^{-5} \text{M}$ sind nur noch 40 - 50 % der Kontrollaktivität vorhanden.

Auf statistisch bedeutsame Unterschiede zwischen den gemessenen Umsätzen der einzelnen Versuchsreihen wurde nach dem Verfahren von KRUSKAL und WALLIS (1952) geprüft. Das Ergebnis zeigt Tab.3. Zwischen den nicht gehemmten Umsätzen und den Umsätzen bei einer Gestagenkonzentration von 10^{-4}M zeigte sich in jedem Fall ein statistisch zumindest auffälliger Unterschied.

Die Kehrwerte der gemessenen Umsätze jedes einzelnen Versuchs wurden nach DIXON gegen die Hemmstoffkonzentrationen aufgetragen, wie dies Abb.3 an einem Beispiel mit Norethisteronacetat als Hemmstoff zeigt. Eine lineare Beziehung in diesen Diagrammen ergab sich bei Lynestrenol und d-Norgestrel bis zu einer Konzentration von 10^{-5}M , bei Allylestrenol und Norethisteronacetat bis $5 \times 10^{-5} \text{M}$. Bei höheren Konzentrationen nahm die Steigung der Geraden ab. Für die Bestimmung der Hemmkonstanten K_1 wurde nur der lineare Teil der Kurven verwendet.

Abb.3 zeigt für Norethisteronacetat einen nichtkompetitiven Hemmtyp. Auch für die anderen getesteten Gestagene wurde dieser Hemmtyp gefunden. Die Hemmkonstanten K_1 sind in Tab.4 zusammengestellt. Sie liegen im Bereich von 10^{-5}M bis $5 \times 10^{-5} \text{M}$.

Tab.2: Hemmung der pNA-Demethylierung durch Gestagene.

Die Werte stellen die entstandene Menge pNP in nMol/mg mikrosomales Protein x min. dar.

Die Werte sind $\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$.

I. Versuchsreihe: Hemmstoff Lynestrenol (3 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	2,5 x 10 ⁻⁵ M pNA	5 x 10 ⁻⁵ M pNA	10 ⁻⁴ M pNA
∅	3,26 ± 0,14	4,65 ± 0,18	7,04 ± 0,38
5 x 10 ⁻⁶ M	2,43 ± 0,12	3,64 ± 0,20	5,49 ± 0,36
10 ⁻⁵ M	2,07 ± 0,12	2,91 ± 0,21	4,53 ± 0,34
2 x 10 ⁻⁵ M	1,81 ± 0,16	2,57 ± 0,26	3,76 ± 0,44
5 x 10 ⁻⁵ M	1,36 ± 0,12	1,82 ± 0,18	2,53 ± 0,20

II. Versuchsreihe: Hemmstoff Allylestrenol (4 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	2,5 x 10 ⁻⁵ M pNA	5 x 10 ⁻⁵ M pNA	10 ⁻⁴ M pNA
∅	3,75 ± 0,19	5,67 ± 0,25	8,07 ± 0,28
5 x 10 ⁻⁶ M	3,54 ± 0,17	5,35 ± 0,25	7,59 ± 0,29
10 ⁻⁵ M	3,27 ± 0,16	4,99 ± 0,21	7,20 ± 0,27
2 x 10 ⁻⁵ M	2,83 ± 0,16	4,09 ± 0,16	6,05 ± 0,25
5 x 10 ⁻⁵ M	1,91 ± 0,12	2,79 ± 0,21	3,92 ± 0,37

III. Versuchsreihe: Hemmstoff Norethisteronacetat (4 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	2,5 x 10 ⁻⁵ M pNA	5 x 10 ⁻⁵ M pNA	10 ⁻⁴ M pNA
∅	3,63 ± 0,26	5,31 ± 0,26	7,71 ± 0,23
5 x 10 ⁻⁶ M	3,26 ± 0,17	5,00 ± 0,24	7,26 ± 0,26
10 ⁻⁵ M	3,00 ± 0,15	4,51 ± 0,23	6,51 ± 0,24
2 x 10 ⁻⁵ M	2,60 ± 0,17	3,81 ± 0,23	5,48 ± 0,25
5 x 10 ⁻⁵ M	1,87 ± 0,14	2,64 ± 0,17	3,82 ± 0,23

IV. Versuchsreihe: Hemmstoff d-Norgestrel (4 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	2,5 x 10 ⁻⁵ M pNA	5 x 10 ⁻⁵ M pNA	10 ⁻⁴ M pNA
∅	2,95 ± 0,10	4,46 ± 0,11	6,49 ± 0,13
5 x 10 ⁻⁶ M	2,41 ± 0,06	3,60 ± 0,10	5,21 ± 0,15
10 ⁻⁵ M	2,09 ± 0,05	2,94 ± 0,17	4,32 ± 0,17
5 x 10 ⁻⁵ M	1,43 ± 0,06	1,89 ± 0,09	2,76 ± 0,09
10 ⁻⁴ M	1,16 ± 0,08	1,66 ± 0,06	2,45 ± 0,05

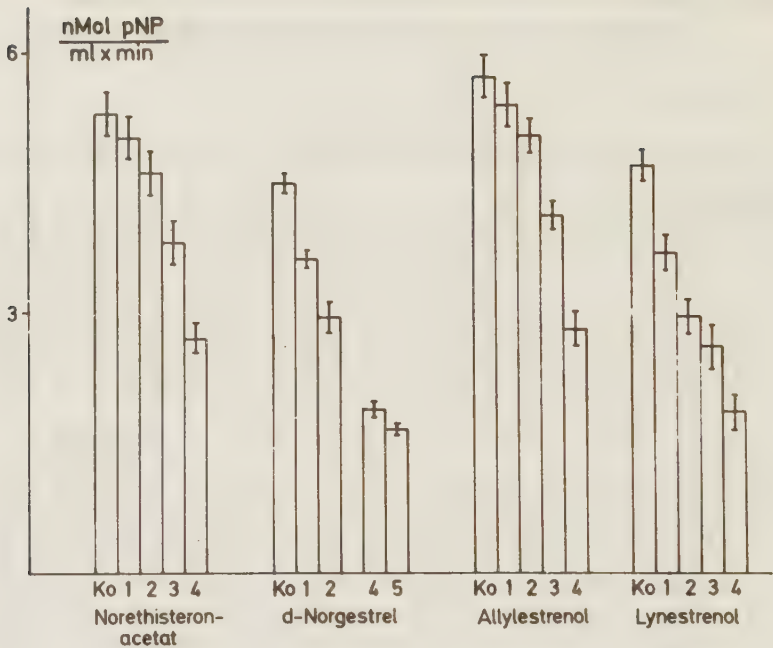


Abb.2 Hemmung der pNA-Demethylierung durch synthetische Gestagene.

Das Inkubationsmedium enthielt in einem Volumen von 2,5 ml 15 μ Mol Glucose-6-Phosphat, 1,4 Einheiten Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, 0,9 μ Mol NADP und 2,5 mg mikrosomales Protein in Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,8. Die Temperatur betrug 30°C. Die pNA-Konzentration war 5×10^{-5} M.

Ko: Kontrollumsätze der einzelnen Versuchsreihen.
1 - 5: Umsätze bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen. 1: 5×10^{-6} M, 2: 10^{-5} M, 3: 2×10^{-5} M, 4: 5×10^{-5} M, 5: 10^{-4} M.

Die Werte sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. 3 - 4 Enzympräparationen, vgl. Tab.2.

Tab.3: Statistisch auffällige Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Versuchsreihen zur Hemmung der pNA-Demethylierung durch Gestagene. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von KRUSKAL und WALLIS (1952).

A: pNA-Konzentration $2,5 \times 10^{-5}M$

B: pNA-Konzentration $5 \times 10^{-5}M$

C: pNA-Konzentration $10^{-4}M$

Ko: Umsatz bei Abwesenheit der Gestagene.

1: Gestagenkonzentration $5 \times 10^{-6}M$

2: Gestagenkonzentration $10^{-5}M$

3: Gestagenkonzentration $2 \times 10^{-5}M$

4: Gestagenkonzentration $5 \times 10^{-5}M$

5: Gestagenkonzentration $10^{-4}M$

+: $p < 0,05$

++: $p < 0,01$

Die nicht aufgeführten Werte zeigen keine statistisch auffälligen Unterschiede.

I: Lynestrenol

	A	
	3	4
Ko		+
1		

	B	
	3	4
Ko		+
1		

	C	
	3	4
Ko		+
1		

II: Norethisteronacetat

	A	
	3	4
Ko		++
1		

	B	
	3	4
Ko		+
1		+

	C	
	3	4
Ko		++
1		

III: Allylestrenol

	A	
	3	4
Ko		+
1		

	B	
	3	4
Ko		+
1		

	C	
	3	4
Ko		++
1		+

IV: d-Norgestrel

	A	
	4	5
Ko	+	++
1		+

	B	
	4	5
Ko	+	++
1		

	C	
	4	5
Ko	+	++
1		+

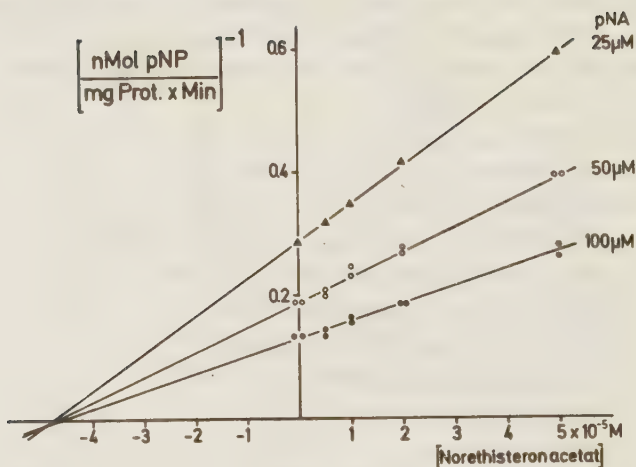


Abb.3 Dixon-Diagramm eines Versuchs zur Hemmung der pNA-Demethylierung durch Norethisteronacetat. Die Versuchsbedingungen sind in der Legende zu Abb.2 beschrieben.

Tab.4: Hemmtyp und Hemmkonstanten von Gestagenen für die pNA-Demethylierung.

	n	Hemmtyp	K_i (µM)
Lynestrenol	3	nichtkompetitiv	19 ± 1
Allylestrenol	4	nichtkompetitiv	47 ± 8
Norethisteronacetat	4	nichtkompetitiv	49 ± 3
d-Norgestrel	4	nichtkompetitiv	22 ± 1

Die Werte sind $\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$. n = Anzahl der Enzympräparationen.

3. Hemmung der Anilinhydroxylierung durch Gestagene

Auch die mikrosomale p-Hydroxylierung von Anilin wird durch Lynestrenol, Allylestrenol, Norethisteronacetat und d-Norgestrel gehemmt. Die geprüften Anilinkonzentrationen waren $1,25 \times 10^{-4}M$, $2,5 \times 10^{-4}M$ und $5 \times 10^{-4}M$. In Tab.5 sind die Ergebnisse der Versuche zusammengestellt.

Abb.4 zeigt den Hemmeffekt der Gestagene für die mittlere Anilinkonzentration von $2,5 \times 10^{-4}M$. Bei einer Hemmstoffkonzentration von $5 \times 10^{-5}M$ werden hier noch 60 - 80 % der Kontrollaktivität gefunden, Halbhemmung wurde erst mit Konzentrationen über $10^{-4}M$ erreicht.

Bei der Prüfung auf statistisch bedeutsame Unterschiede nach KRUSKAL und WALLIS fanden sich für die beiden niedrigen Anilinkonzentrationen statistisch zumindest auffällige Unterschiede zwischen den nicht gehemmten Umsätzen und den Umsätzen bei einer Gestagenkonzentration von $5 \times 10^{-4}M$ (Tab.6).

In den Dixon-Diagrammen fanden sich lineare Beziehungen bis zu einer Konzentration von $5 \times 10^{-5}M$, für diesen Bereich wurden die Hemmkonstanten ermittelt. In Abb.5 ist das Ergebnis eines Versuchs mit d-Norgestrel als Inhibitor graphisch dargestellt. Der Hemmtyp imponiert hier als kompetitiv; dasselbe gilt für Norethisteronacetat. Für Lynestrenol fand sich ebenso wie für Allylestrenol ein nichtkompetitiver Hemmtyp. Die Hemmkonstanten liegen im Bereich von $5 \times 10^{-5}M$ bis $2 \times 10^{-4}M$. Die genauen Werte sind aus Tab.7 ersichtlich.

Tab.5: Hemmung der p-Hydroxylierung von Anilin durch Gestagene. Die Werte stellen die entstandene Menge pAP in nMol/mg mikrosomales Protein x min. dar. Die Werte sind $\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$.

I. Versuchsreihe: Hemmstoff Lynestrenol (4 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	Anilin $1,25 \times 10^{-4} M$	Anilin $2,5 \times 10^{-4} M$	Anilin $5 \times 10^{-4} M$
$\emptyset$	$0,60 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,06$	$1,04 \pm 0,09$
$10^{-5} M$	$0,53 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,07$
$5 \times 10^{-5} M$	$0,42 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,04$
$10^{-4} M$	$0,39 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,05$
$5 \times 10^{-4} M$	$0,30 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,03$

II. Versuchsreihe: Hemmstoff Allylestrenol (5 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	Anilin $1,25 \times 10^{-4} M$	Anilin $2,5 \times 10^{-4} M$	Anilin $5 \times 10^{-4} M$
$\emptyset$	$0,68 \pm 0,05$	$0,82 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,10$
$10^{-5} M$	$0,58 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,09$
$5 \times 10^{-5} M$	$0,42 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,05$	$0,70 \pm 0,07$
$10^{-4} M$	$0,36 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,06$
$5 \times 10^{-4} M$	$0,30 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,07$

III. Versuchsreihe: Hemmstoff Norethisteronacetat (3 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	Anilin $1,25 \times 10^{-4} M$	Anilin $2,5 \times 10^{-4} M$	Anilin $5 \times 10^{-4} M$
$\emptyset$	$0,75 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,11$
$10^{-5} M$	$0,64 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,05$	$1,12 \pm 0,12$
$5 \times 10^{-5} M$	$0,49 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,06$	$0,98 \pm 0,12$
$10^{-4} M$	$0,44 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,09$
$5 \times 10^{-4} M$	$0,39 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,06$

IV. Versuchsreihe: Hemmstoff d-Norgestrel (4 Enzympräparationen)

Hemmstoff Konzentration	Anilin $1,25 \times 10^{-4} M$	Anilin $2,5 \times 10^{-4} M$	Anilin $5 \times 10^{-4} M$
$\emptyset$	$0,58 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,06$	$1,03 \pm 0,07$
$10^{-5} M$	$0,50 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,07$
$5 \times 10^{-5} M$	$0,34 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,04$
$10^{-4} M$	$0,33 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,04$
$5 \times 10^{-4} M$	$0,29 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,04$

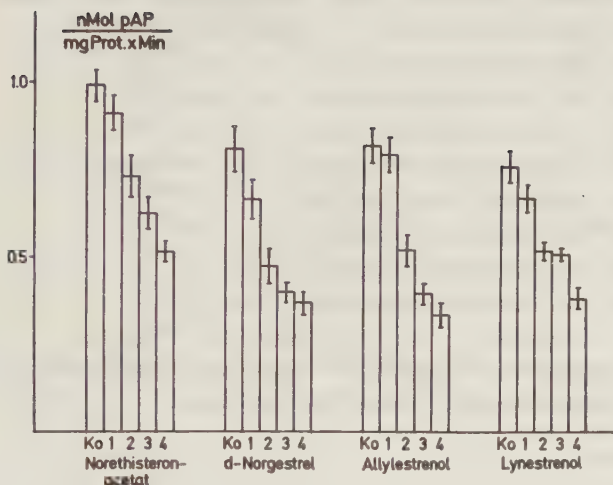


Abb.4 Hemmung der Anilinhydroxylierung durch synthetische Gestagene.

Die Bestandteile des Inkubationssystems sind in der Legende zu Abb.2 beschrieben.

Die Anilinkonzentration betrug $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$.

Ko: Kontrollumsätze der einzelnen Versuchsreihen

1 - 4: Umsätze bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen: 1: 10^{-5}M , 2: $5 \times 10^{-5} \text{M}$, 3: 10^{-4}M , 4: $5 \times 10^{-4} \text{M}$.

Die Werte sind $\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$. 3 - 5 Enzympräparationen.

Tab.6: Statistisch auffällige Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Versuchsreihen zur Hemmung der Anilin-Hydroxylierung durch Gestagene. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von KRUSKAL und WALLIS (1952).

A: Anilin-Konzentration $1,25 \times 10^{-4}M$

B: Anilin-Konzentration $2,5 \times 10^{-4}M$

C: Anilin-Konzentration $5 \times 10^{-4}M$

Ko: Umsatz bei Abwesenheit der Gestagene

1: Gestagenkonzentration $10^{-5}M$

2: Gestagenkonzentration $5 \times 10^{-5}M$

3: Gestagenkonzentration $10^{-4}M$

4: Gestagenkonzentration $5 \times 10^{-4}M$

+: $p < 0,05$

++: $p < 0,01$

Die nicht aufgeführten Werte zeigten keine statistisch auffälligen Unterschiede.

I: Lynestrenol

	A	
	3	4
Ko		++
1		+

	B	
	3	4
Ko		+
1		

	C	
	3	4
Ko		
1		

II: Norethisteronacetat

	A	
	3	4
Ko	+	++
1		+

	B	
	3	4
Ko	+	++
1		+

	C	
	3	4
Ko		
1		

III: Allylestrenol

	A	
	3	4
Ko		++
1		+

	B	
	3	4
Ko	+	++
1		+

	C	
	3	4
Ko		
1		

IV: d-Norgestrel

	A	
	3	4
Ko		+
1		

	B	
	3	4
Ko		+
1		

	C	
	3	4
Ko		+
1		

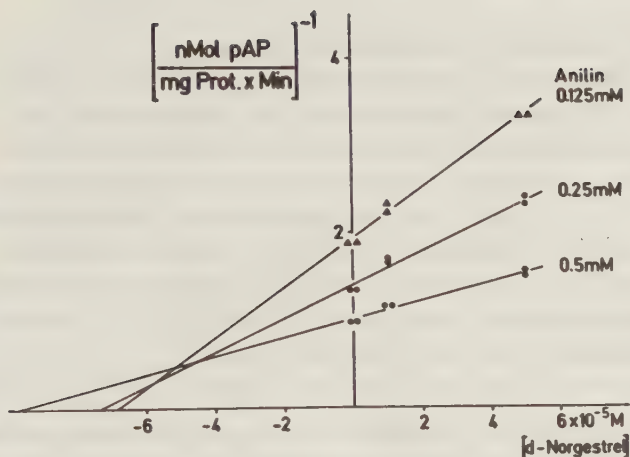


Abb.5 Dixon-Diagramm eines Versuchs zur Hemmung der Anilinhydroxylierung durch d-Norgestrel. Die Versuchsbedingungen sind in der Legende zu Abb.2 beschrieben.

Tab.7: Hemmtyp und Hemmkonstanten K_i von Gestagenen für die Anilinhydroxylierung.

	n	Hemmtyp	K_i (μM)
Lynestrenol	4	nichtkompetitiv	112 ± 16
Allylestrenol	5	nichtkompetitiv	82 ± 8
Norethisteronacetat	3	kompetitiv	45 ± 19
d-Norgestrel	4	kompetitiv	46 ± 3

Die Werte sind $\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$. n = Anzahl der Enzympräparationen.

4. Untersuchungen zum Stoffwechsel von Metyrapon in Lebermikrosomen

a. Nachweis dreier Metyraponmetabolite

Bei der Untersuchung des Metyraponstoffwechsels unter aeroben Bedingungen fanden sich drei Metabolite, die dünnschichtchromatographisch deutlich getrennt waren. Eine dieser Substanzen war reduziertes Metyrapon, das von KAHL (1970) als einziger mikrosomaler Metyraponmetabolit beschrieben worden war. Mit Methanol-Chloroform 10:90 (V/V) als Fließmittel war die Trennung besser als bei einem Mischungsverhältnis von 20:80. Die R_f -Werte der Substanzen sind in Tab.8 aufgeführt.

Tab.8: R_f -Werte von Metyrapon und seinen Metaboliten auf Kieselgel F 254-Fertigplatten (Fa.E.Merck, Darmstadt) mit Methanol-Chloroform als Fließmittel.

	Methanol-Chloroform 10:90	20:80
Metyrapon	0,48	0,64
Red.Metyrapon	0,17	0,40
Metabolit "I"	0,22	0,43
Metabolit "II"	0,26	0,46

Die beiden neu entdeckten Metabolite unterscheiden sich von dem von KAHL und DÜNGES (1971) beschriebenen Metaboliten, der durch ein im 105000 x g-Überstand lokalisierendes Enzymsystem gebildet wird. Dies zeigen unterschiedliche Laufstrecken im Chromatogramm mit Methanol-Chloroform 20:80 (V/V) als Fließmittel und die unterschiedlichen UV-Spektren. Die neuen Metabolite zeigen ebenso wie Metyrapon und red.Metyrapon ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (Abb.6), während der Überstandsmetabolit eine Rechtsverschiebung seines UV-Spektrums aufweist, dessen Maximum bei 285 nm erscheint. Einer der beiden neuen Metabolite (Metabolit "I") zeigt zusätzlich ein Maximum bei 232 nm.

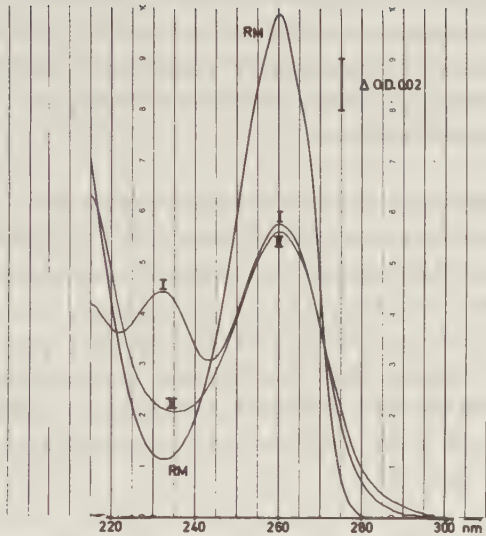


Abb.6 UV-Spektren von red.Metyrapon und zwei unidentifizierten Metyraponmetaboliten.
Die Substanzen wurden aus der Kieselgelplatte ausgekratzt und in Glycinpuffer pH 1,3 eluiert. Die Spektren wurden mit einem Beckman-Spektralphotometer aufgenommen und direkt gegen einen ebenfalls ausgekratzten Leerwert aufgezeichnet. Das Spektrum des Leerwerts entspricht der Grundlinie.

Die unidentifizierten Stoffwechselprodukte entstehen auch, wenn man den mikrosomalen Enzymen reduziertes Metyrapon als Substrat anbietet. Dies ist z.B. in Abb.8e dargestellt.

Die enzymatische Entstehung der Substanzen ist durch Abb.8f belegt: Nach Inaktivierung der mikrosomalen Enzyme durch 10-minütiges Erhitzen auf 85°C waren sie nicht nachweisbar, wenn unter sonst unveränderten Bedingungen Metyrapon oder reduziertes Metyrapon als Substrat angeboten wurden.

b. Sauerstoffabhängigkeit des Metyraponmetabolismus

Um die Abhängigkeit der Entstehung der Metyraponmetabolite vom Luftsauerstoff zu prüfen, wurden Ansätze in Anoxie und in Anwesenheit von Sauerstoff, die jeweils polarographisch gesichert waren, inkubiert. Die Reduktion von Metyrapon läuft auch in Anoxie ab. Dagegen werden die Metabolite "I" und "II" nur in Anwesenheit von Sauerstoff gebildet, bei Anoxie waren sie nicht nachweisbar (Abb.7).

c. Induzierbarkeit des O_2 -abhängigen Stoffwechsels von Metyrapon durch Phenobarbitalvorbehandlung

Es wurde geprüft, ob der sauerstoffabhängige Stoffwechsel, wie von vielen oxydativen Reaktionen im Arzneimittelstoffwechsel bekannt, durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenobarbital gesteigert werden kann. In Abb.8 ist das Chromatogramm eines Stimulierungsversuches dargestellt. Man erkennt, daß der sauerstoffabhängige Metabolismus von Metyrapon im Gegensatz zum reduktiven Abbauweg durch Phenobarbitalvorbehandlung um ein Mehrfaches zu steigern ist. Die Ergebnisse der Stimulierung durch Phenobarbital sind in Tab.9 zusammengestellt.

Tab.9: Stimulierung des O_2 -abhängigen Stoffwechsels von Metyrapon durch Phenobarbitalvorbehandlung. Die Werte stellen die Extinktionsdifferenzen zwischen 260 nm und 285 nm dar, die erhalten wurden, nachdem die chromatographisch getrennten Substanzen aus der Kieselgelplatte ausgekratzt, in 3 ml Glycinpuffer pH 1,3 eluiert und in einem Beckman-Spektralphotometer gegen einen Leerwert gemessen worden waren.

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Ko	PB	Ko	PB	Ko	PB
Red.Metyrapon	235	245	300	310	240	306
Metabolit "I"	8	135	44	192	60	150
Metabolit "II"	22	114	58	166	76	140

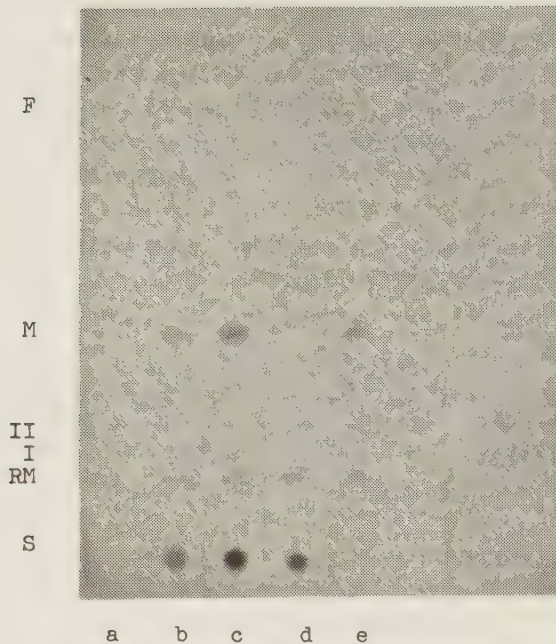


Abb.7 Mikrosomaler Metyraponstoffwechsel unter aeroben und anoxischen Bedingungen.
Die Substanzflecke sind als Löschungen der Fluoreszenz auf Kieselgel F 254-Platten nach Anregung mit UV-Licht (254 nm) erkennbar.
F: Lösungsmittelfront; M: Metyrapon; RM: Reduziertes Metyrapon; I und II: Neue unidentifizierte Metabolite; S: Startpunkte.
Das Inkubationsmedium wurde in Abb.2 beschrieben. Die Temperatur betrug 30°C, der pH-Wert 7,4. Die Metyraponkonzentration war 10^{-3} M.
a: Leerwert; b: Stoffwechsel von Metyrapon in Anoxie; c: Stoffwechsel unter aeroben Verhältnissen; d: Interner Standard red.Metyrapon; e: Externer Standard Metyrapon und red.Metyrapon.

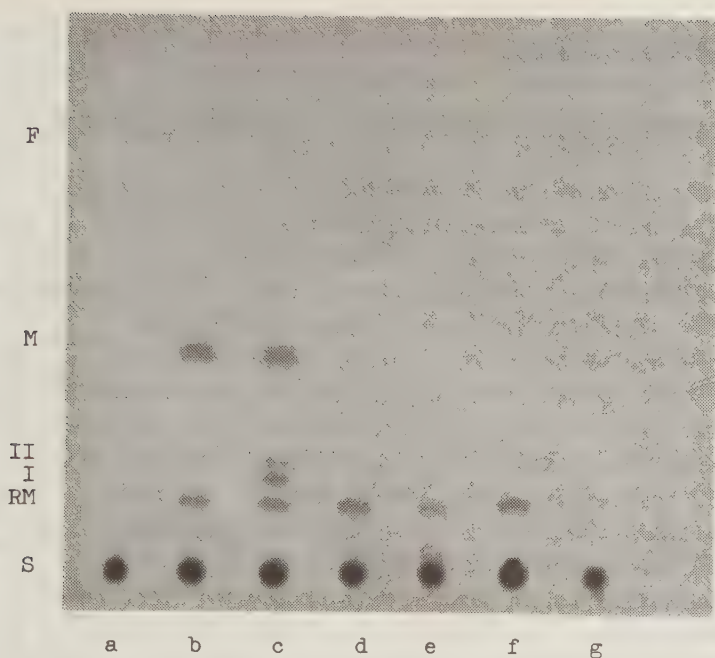


Abb.8 Stimulierung des O_2 -abhängigen mikrosomalen Metabolismus von Metyrapon und red.Metyrapon durch Phenobarbitalvorbehandlung.

Die Inkubationsbedingungen sind in Abb.7 beschrieben. Die Metyraponkonzentration betrug $10^{-3}M$, die Konzentration von red.Metyrapon $2 \times 10^{-4}M$.

F: Lösungsmittelfront; M: Metyrapon; RM: Reduziertes Metyrapon; I und II: Neue unidentifizierte Metabolite; S: Startpunkte.

a: Leerwert; b und c: Stoffwechsel von Metyrapon, b in Mikrosomen von Kontrollratten, c von PB-vorbehandelten Ratten; d und e: Stoffwechsel von red.Metyrapon, d in Mikrosomen von Kontrollratten, e von PB-behandelten Ratten; f: Inkubation von red.Metyrapon mit zuvor 10 min. auf $85^{\circ}C$ erhitzten Mikrosomen; g: Interner Standard (Metyrapon und red.Metyrapon).

D I S K U S S I O N

1. Hemmwirkung der synthetischen Gestagene in vitro

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Lynestrenol, Allylestrenol, d-Norgestrel und Norethisteronacetat an Cytochrom P-450 gebunden werden und in der Lage sind, den Stoffwechsel von anderen Substraten der mischfunktionalen Oxydation in Lebermikrosomen zu hemmen.

Da die Wasserlöslichkeit dieser Steroide gering ist, erscheint es problematisch, die in dem Versuchssystem tatsächlich vorliegenden Konzentrationen der Substanzen anzugeben. Als indirekter Beweis für ihre Lösung im Inkubationssystem muß herangezogen werden, daß sich in einem bestimmten Konzentrationsbereich eine gesetzmäßige Zunahme der spektralen Bindungseffekte ergab, die bei doppelt reziproker Darstellung linear verlief. Außerdem fand sich auch in den Dixon-Diagrammen, in denen die Effekte der Substanzen in Abhängigkeit von der eingegebenen Gestagenmenge dargestellt wurden, in einem bestimmten Konzentrationsbereich Linearität. Die Tatsache, daß bei Gestagenzugabe über eine errechnete Konzentration von maximal $10^{-4}M$ hinaus keine lineare Wirkungszunahme mehr zu erreichen war, läßt auf eine Sättigung des Versuchssystems mit den Gestagenen schließen.

Die Hemmwirkung der untersuchten Substanzen liegt in derselben Größenordnung wie die anderer Gestagene (TEPHLY und MANNERING, 1968; SOYKA und LONG, 1972) und ist vergleichbar mit dem Effekt von gebräuchlichen Hemmstoffen, wie Metyrapon und SKF 525-A. Die K_i von Metyrapon für die pNA-Demethylierung beträgt $0,6 \times 10^{-5}M$ (LIER, 1972), die K_i von SKF 525-A für die Äthylmorphin-Demethylierung $1,24 \times 10^{-5}M$ (ANDERS und MANNERING, 1966). Die Hemmkonstanten der Gestagene für die pNA-Demethylierung liegen zwischen $10^{-5}M$ und $5 \times 10^{-5}M$.

In dem arzneimittelhydroxylierenden Enzymsystem sind verschiedene Angriffspunkte für Hemmstoffe anzunehmen. So kann eine Destruktion von NADPH oder eine Unterbrechung des Elektronentransports zum Cytochrom P-450 zu einem Sistieren der Fremdstoffoxydation führen (NETTER, 1972). Im Zusammenhang dieser Arbeit wichtiger sind Inhibitoren, die mit dem Cytochrom selbst reagieren. Hierbei sind zwei Mechanismen zu unterscheiden. Einmal kann der Sauerstoff aus seiner Bindung an das Häm-Eisen verdrängt werden, wie dies bei Kohlenmonoxid und wahrscheinlich auch bei solchen Inhibitoren, die als Typ II-Substrate gebunden werden, wie z.B. Metyrapon, der Fall ist. Zum anderen können Inhibitoren mit dem Substrat um den Bindungsort am Cytochrom und um den aktivierten Sauerstoff konkurrieren. Dieser Mechanismus wird z.B. für die Hemmwirkung von SKF 525-A verantwortlich gemacht (ANDERS und MANNERING, 1966).

Im Gegensatz zu Progesteron, das ein Typ II-Spektrum ausbildet (SOYKA und LONG, 1972), werden Lynestrenol, Allylestrenol, d-Norgestrel und Norethisteronacetat in der Form von Typ I-Substraten an das Cytochrom P-450 gebunden. Dies und die Tatsache, daß ihre spektralen Dissoziationskonstanten und ihre Hemmkonstanten für die pNA-Demethylierung in derselben Größenordnung liegen, spricht für eine Konkurrenz mit dem Substrat um das Cytochrom. Bei pNA, das den Typ I-Substraten zugeordnet wird (LIER, 1972; NETTER, 1972), wäre eine Verdrängung vom Bindungsort anzunehmen, bei dem Typ II-Substrat Anilin möglicherweise eine allosterische Hemmung. Der dabei zu erwartende kompetitive Hemmechanismus wird auch bei vergleichbaren Beispielen in der Literatur nicht durchgehend gefunden. Hierbei ist zu beachten, daß die formalen Aussagen über Hemmechanismen mit einem auf der Michaelis-Menten-Kinetik beruhenden Verfahren gewonnen werden, die strenggenommen nur auf gereinigte Enzyme angewendet werden darf. Für das relativ ungereinigte Enzymsystem der Lebermikro-

somen stellt die (allgemein übliche) Anwendung dieser Kinetik nur einen Versuch dar, unter gleichen Versuchsbedingungen über die Wirkung verschiedener Substanzen eine Aussage zu machen und sie vergleichen zu können. Immerhin fällt auf, daß Norethisteronacetat und d-Norgestrel, bei denen eine formal kompetitive Hemmung der Anilinhydroxylierung gefunden wurde, sich strukturell von Lynestrenol und Allylestrenol, die eine nichtkompetitive Hemmung bewirken, unterscheiden. Norethisteronacetat und d-Norgestrel besitzen ebenso wie Progesteron am C₃-Atom im Ring A des Sterangerüsts eine Ketogruppe, und auch Progesteron hemmt die Anilinhydroxylierung in Rattenlebermikrosomen kompetitiv (SOYKA und LONG, 1972; TEPHLY und MANNERING, 1968).

2. Mögliche klinische Bedeutung der Hemmwirkung der Gestagene

Eine Übertragung der Ergebnisse, die in vitro mit Rattenlebermikrosomen gewonnen wurden, auf in vivo-Verhältnisse beim Menschen ist problematisch. Bei der Einnahme hormonaler Kontrazeptiva werden dem Körper täglich maximal 5 mg synthetische Gestagene zugeführt. Die Konzentrationen der Substanzen in der Leber liegen dann weit niedriger als die Konzentrationen, die in vitro in der Lage sind, den Arzneimittelstoffwechsel zu hemmen. Bei Gestagenbehandlungen mit hohen Dosen, z.B. beim drohenden Abort, dürften diese hemmenden Konzentrationen allerdings erreicht werden. Ferner ist zu beachten, daß in Tierversuchen nicht nur eine Hemmung, sondern auch eine Induktion der arzneimittelabbauenden Enzyme durch langdauernde Anwendung von Gestagenen beobachtet wurde, z.B. bei Lynestrenol (RÜMKE und NCORDHOEK, 1969), Norethynodrel (JUCHAU und FOUTS, 1966) und Medroxyprogesteronacetat (JORI et al., 1969). Ein solcher Induktionseffekt der Gestagene ist allerdings beim Menschen noch nicht festge-

stellt worden. Die wenigen Studien, die bisher mit Frauen, die hormonale Kontrazeptiva einnahmen, durchgeführt wurden, deuten vielmehr auf eine Wirkungsverstärkung anderer Arzneimittel durch die dabei zur Anwendung kommenden Steroiddosen hin.

CRAWFORD und RUDOFISKY (1966) fanden bei Frauen unter dem Einfluß von oralen Kontrazeptiva eine vermehrte Ausscheidung von unmetabolisiertem Pethidin und Promazin. O'MALLEY et al. (1972) beobachteten eine Verlängerung der Halbwertszeit von Antipyrin um etwa 30 % bei Frauen, die verschiedene Kontrazeptiva einnahmen, gegenüber einer Kontrollgruppe.

Diese Befunde sind nicht allein durch eine Hemmung des oxydativen Arzneimittelstoffwechsels durch den Gestagenanteil der Kontrazeptiva zu erklären, wenn man berücksichtigt, daß die bei der Ratte in vitro erforderlichen Hemmkonzentrationen etwa 100-fach höher liegen als die beim Menschen zu erwartenden Konzentrationen. Auch eine wesentliche Verstärkung der Hemmwirkung durch den Östrogenanteil erscheint unwahrscheinlich. Zwar können Mestranol und Äthinylöstradiol in vitro ebenfalls den oxydativen Metabolismus von pNA hemmen (LEE und CHEN, 1971), doch ist das Verhältnis von hierzu nötiger zu der in der menschlichen Leber zu erwartenden Konzentration noch extremer als bei den Gestagenen.

SOYKA und LONG (1972) zeigten, daß Metabolite des Progesterons, wie Pregnanedion und Pregnanolon, eine höhere inhibitorische Potenz als die Ausgangssubstanz aufweisen. Die Bildung aktiverer Metabolite der synthetischen Gestagene konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings, zumindest für in vitro-Verhältnisse, durch Vorinkubationsversuche unwahrscheinlich gemacht werden. In diesen Versuchen konnte keine Verstärkung der Hemmwirkung beobachtet werden, wenn die eingesetzten Gestagene vor der Zugabe des Substrats längere Zeit in der mikrosomalen Suspension mit NADPH und Sauerstoff in Berührung gebracht wurden und so Gelegenheit erhielten, Metaboliten zu bilden.

3. Der Stoffwechsel von Metyrapon in Lebermikrosomen

KAHL beschrieb 1970 die Bildung zweier Metabolite von Metyrapon in der Rattenleber. Der eine entsteht im mikrosomenfreien 105000 x g - Überstand. Hierbei handelt es sich möglicherweise um ein methyliertes Produkt. Der Hauptmetabolit des Metyrapons ist ein an der aliphatischen Ketogruppe reduziertes Produkt, das in der mikrosomalen Fraktion gebildet wird. Es wurde schon früher im menschlichen Urin (SPRUNT et al., 1967) und in tierischen Geweben (KRAULIS et al., 1968) gefunden. Diese beiden Metabolite wurden von KAHL sowohl in vitro als auch in der isoliert perfundierten Rattenleber nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit werden zusätzlich zu den schon bekannten zwei neue Metyraponmetabolite beschrieben. Ihre Entstehung ist sauerstoffabhängig. Durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenobarbital läßt sich eine mehrfache Steigerung dieser Abbauege erzielen, im Gegensatz zur Metyrapon-Reduktion. Diese Befunde weisen darauf hin, daß es sich bei den neuen Stoffwechselprodukten möglicherweise um hydroxylierte Substanzen handeln könnte. Auch das reduzierte Metyrapon kann als Ausgangssubstanz für die beiden neuen Metaboliten dienen. Als Ansatzpunkte für die Hydroxylierungen kämen in erster Linie die aromatischen Pyridinringe in Frage. Metyrapon wäre dann als ein Substrat der mischfunktionellen Oxydase der Lebermikrosomen anzusehen. Diese Interpretation wird gestützt durch neuere Befunde, die zeigen, daß als Kofaktor für den sauerstoffabhängigen Metyraponstoffwechsel NADPH notwendig ist und daß dieser Abbauweg durch Kohlenmonoxid blockiert wird (R.KAHL et al., 1974).

4. Vergleich von Metyrapon- und Steroidstoffwechsel

Metyrapon wird in den Lebermikrosomen sowohl oxydativ als auch reduktiv abgebaut. Hierin gleicht es den Steroiden. Auch deren oxydativer Stoffwechsel ist O₂- und

NADPH-abhängig und durch Phenobarbitalvorbehandlung stimulierbar. Für die Hydroxylierungen der Steroide wird, ebenso wie in dieser Arbeit für Metyrapon vermutet, das arzneimitteloxydierende Enzymsystem der Lebermikrosomen mit dem Cytochrom P-450 verantwortlich gemacht (KUNTZ-MAN et al., 1964).

Auch die Steroid-5 α -Reduktasen sind in der mikrosomalen Fraktion der Leberzellen lokalisiert (TOMKINS, 1957). Wie die Metyraponreduktase sind sie NADPH-abhängig (Mc GUIRE et al., 1960) und nicht durch Kohlenmonoxid hemmbar (v.BAHR et al., 1969). Eine Stimulierung durch Phenobarbitalvorbehandlung findet sich bei der Steroid-5 α -Reduktion, nicht aber bei der Metyraponreduktion. Die Metyraponreduktion wird durch Cytochrom c gehemmt, die Steroid-5 α -Reduktion dagegen nicht. Anhand dieser Befunde diskutiert FAHL (1970b) für die Metyraponreduktion eine Beteiligung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, v.BAHR et al. halten eine Beteiligung von Teilen des fremdstoffhydroxylierenden Enzymsystems bei der Steroid-5 α -Reduktion für unwahrscheinlich (1969).

5. Mögliche Zusammenhänge zwischen dem O₂-abhängigen Metabolismus und dem Hemmechanismus von Metyrapon

Während zur Deutung der inhibitorischen Wirkung von Metyrapon auf die 11 β -Steroidhydroxylierung in den Nebennierenmitochondrien ein mit dieser konkurrierender Stoffwechsel des Metyrapons vermutet wurde (WILLIAMSON und O'DONNELL, 1967), hat man einen solchen Mechanismus bisher nicht als Erklärung für die Hemmwirkung des Metyrapons auf die mikrosomale Arzneimittelhydroxylierung herangezogen. Vielmehr schreibt man dem Metyrapon eine ähnliche Wirkung wie dem Kohlenmonoxid zu, in dem Sinne, daß Metyrapon an das Hämisen des Cytochrom P-450 gebunden wird (LUTTER, 1972) und so den Redoxzyklus des Cytochroms hemmt (LITR, 1972).

Frühere Befunde zum Einfluß von Metyrapon auf den Elektronentransport zum Cytochrom P-450 sind anhand der Ergebnisse zum oxydativen Metyraponstoffwechsel neu zu interpretieren. KAHL (1970b) fand keine Veränderung der Sauerstoffaufnahme in Mikrosomen in Anwesenheit von Metyrapon und schloß daraus auf einen unveränderten Elektronentransport zum Cytochrom. Nimmt man aber einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs durch eine oxydative Verstoffwechslung des Metyrapons an, könnte sich in der gemessenen unveränderten Sauerstoffaufnahme eine Hemmung des Elektronentransports zum Cytochrom P-450 verbergen.

Die Tatsache, daß sowohl Metyrapon als auch reduziertes Metyrapon Substrate der mischfunktionellen Oxydase sind, darf bei der Erklärung der Hemmwirkung dieser beiden Substanzen nicht außer Acht gelassen werden. Eine Konkurrenz mit dem Stoffwechsel anderer Substrate ist in Betracht zu ziehen. Allerdings spricht die Tatsache, daß die Michaeliskonstanten der beiden oxydativen Prozesse mit etwa $10^{-4}M$ (R.KAHL et al., 1974) wesentlich größer sind als die Inhibitorkonstante des Metyrapons gegenüber einer Reihe von Abbauwegen anderer Arzneimittel, die mit etwa $10^{-5}M$ angegeben wird, gegen eine solche Interpretation.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die synthetischen Gestagene Lynestrenol, Allylestrenol, Norethisteronacetat und d-Norgestrel werden in Form von Typ I-Substraten in Rattenlebermikrosomen unter aeroben Bedingungen gebunden. Ihre spektralen Dissoziationskonstanten K_s liegen zwischen $10^{-5}M$ und $5 \times 10^{-5}M$.
2. Die Demethylierung von p-Nitroanisol und die p-Hydroxylierung von Anilin werden in vitro durch die vier Gestagene gehemmt. Die Hemmkonstanten für die pNA-Demethylierung liegen zwischen $10^{-5}M$ und $5 \times 10^{-5}M$ und sind etwas niedriger als die für die Anilinhydroxylierung ($5 \times 10^{-5}M$ bis $2 \times 10^{-4}M$).
3. Nach Inkubation von Metyrapon in Rattenlebermikrosomen in Anwesenheit von O_2 und NADPH lassen sich dünnschichtchromatographisch drei Metabolite nachweisen. Neben dem bekannten reduzierten Metyrapon sind dies zwei neue Stoffwechselprodukte von unbekannter Struktur. Diese zeigen wie Metyrapon und reduziertes Metyrapon im UV-Spektrum ein Maximum bei 260 nm. In Anoxie werden sie, anders als reduziertes Metyrapon, nicht gebildet. Bietet man den Mikrosomen reduziertes Metyrapon als Substrat an, lassen sich die zwei neuen Metabolite ebenfalls nachweisen. Durch Phenobarbitalvorbehandlung der Versuchstiere werden die neu gefundenen Abbauewege, im Gegensatz zur Metyraponreduktion, um ein Mehrfaches gesteigert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAHAM, R. und H.J. STAUDINGER: Isolierung und Identifizierung eines neuen Testosteronmetaboliten 5 α -Androstentriol-(3 α , 6 β , 17 β). Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 346, 198 (1966)
- ALVAREZ, A.P., G. SCHILLING, W. LEVIN and R. KUNTZMAN: Alteration of the microsomal hemoprotein by 3-methylcholanthrene: effect of ethionine and actinomycin D. J.Pharmacol.exp.Ther. 163, 417 (1968)
- ANDERS, M.W. and G.J. MANNERING: Inhibition of drug metabolism. I. Kinetics of the inhibition of the N-demethylation of ethylmorphine by 2-diethylaminoethyl 2,2-diphenylvalerate HCl (SKF 525-A) and related compounds. Molec.Pharmacol. 2, 319 (1966)
- AXELROD, J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine. J.Pharmacol.exp.Ther. 115, 259 (1955)
- AXELROD, L.R. and L.L. MILLER: The biooxidation of steroids at carbon 6 by isolated perfused rat liver. Archs. Biochem.Biophys. 49, 248 (1954)
- BAHR, C.von, B.P. LISBOA and S. ORRENIUS: Influence of phenobarbital pretreatment on the in vitro ring A reduction of Δ^4 -3-oxo-steroids in rat liver microsomes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak. 264, 420 (1969)
- BIDLEMAN, K. and G.J. MANNERING: Induction of drug metabolism. V. Independent formation of cytochromes P-450 and P₁-450 in rats treated with phenobarbital and 3-methylcholanthrene simultaneously. Molec.Pharmacol. 6, 697 (1970)
- BIGGS, J.T.Jr., J.R. CARTER and R.C. TROOP: Effect of heparin on the metabolism of cortisone by subcellular fractions of rat liver. Europ.J.Pharmacol. 2, 42 (1967)
- BLACKHAM, A. and P.S.J. SPENCER: The effects of oestrogens and progestins on the response of mice to barbiturates. Brit.J.Pharmacol. 37, 129 (1969)

- BLACKHAM,A. and P.S.J.SPENCER: Response of female mice to anticonvulsant after pretreatment with sex steroids. *J.Pharm.Pharmacol.* 22, 304 (1970)
- BREUER,H., R.KNUPPEN und G.PANGELS: Konfiguration, Biogenese und Stoffwechsel von 6 α - und 6 β -hydroxylierten phenolischen Steroiden. *Biochim.biophys. Acta* 65, 1 (1962)
- BRODIE,B.B. and J.AXELROD: The fate of acetanilide in man. *J.Pharmacol.exp.Ther.* 94, 29 (1948)
- BRODIE,B.B. and J.AXELROD: The fate of aminopyrine (Pyramidon) in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material. *J.Pharmacol.exp.Ther.* 99, 171 (1950)
- BROWN,R.R., J.A.MILLER and E.C.MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV.Dietary factors enhancing demethylation in vitro. *J.biol.Chem.* 209, 211 (1954)
- BRYSON,M.Y. and M.L.SWEAT: Cleavage of cholesterol side chain associated with cytochrome P-450, flavoprotein, and nonheme iron-protein derived from the bovine adrenal cortex. *J.biol.Chem.* 243, 2799 (1968)
- BURSTEIN,S. and E.L.KLAIBER: Phenobarbital-induced increase in 6- β -hydroxycortisol excretion: due to its significance in human urine. *J.clin.Endocrin.* 25, 293 (1965)
- CARLSON,G.P. and K.P.DuBOIS: Studies on the induction of nitroreductase activity by DDT and phenobarbital. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 17, 203 (1970)
- CLAUDE,A.: *Proc.Soc.exp.biol.Med.* 39, 398 (1938);
zit.nach CLAUDE,A.: Microsomes, endoplasmic reticulum and interactions of cytoplasmic membranes. In: GILLETTE et al. (1969), p.3
- CONNEY,A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol.Rev.* 19, 317 (1967)
- CONNEY,A.H., E.C.MILLER and J.A.MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes. V.Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 16, 450 (1956)

- CONNEY, A.H., E.C. MILLER and J.A. MILLER: Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver. *J. biol. Chem.* 228, 753 (1957)
- CONNEY, A.H. and A. KLUTCH: increased activity of androgen hydroxylases in liver microsomes of rats pretreated with phenobarbital and other drugs. *J. biol. Chem.* 238, 1611 (1963)
- CONNEY, A.H. and K. SCHNEIDMAN: Enhanced androgen hydroxylase activity in liver microsomes of rats and dogs treated with phenylbutazone. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 146, 225 (1964)
- CONNEY, A.H., M. JACOBSON, W. LEVIN, K. SCHNEIDMAN and R. KUNTZMAN: Decreased central depressant effect of progesterone and other steroids in rats pretreated with drugs and insecticides. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 154, 310 (1966)
- CONNEY, A.H., W. LEVIN, M. IKEDA, R. KUNTZMAN, D.Y. COOPER and O. ROSENTHAL: Inhibitory effect of carbon monoxide on the hydroxylation of testosterone by rat liver microsomes. *J. biol. Chem.* 243, 3912 (1968)
- COOPER, D.Y., S. LEVIN, S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL and R.W. ESTABROOK: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase system. *Science* 147, 200 (1965) a
- COOPER, D.Y., S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL and R.W. ESTABROOK: Spectral and kinetic studies of microsomal pigment. In: KING, T.E., H.S. MASON and M. MORRISON (Eds.): Oxidase and related redox systems. New York 1965 b, p. 838
- COOPER, D.Y., H. SCHLEYER and O. ROSENTHAL: Role of cytochrome P-450 in mixed function oxidases using the reconstituted steroid 11 β -hydroxylase of adrenal mitochondria as an example. Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chem.* 349, 1592 (1968)

- CRAWFORD, J.S. and S. RUDOFISKY: Some alterations in the pattern of drug metabolism associated with pregnancy; oral contraceptives, and the newly born. *Brit.J.Anaesth.* 38, 448 (1966)
- CULP, H.W. and R.E. McMAHON: The NADPH₂ dependent reduction of acetohexamide and related carbonyl compounds by a rabbit kidney enzyme. *Fed.Proc.* 24, 426 (1965)
- DALLNER, G., P. SIEKEVITZ and G.E. PALADE: Biogenesis of endoplasmic reticulum membrane. II. Synthesis of consecutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte. *J.Cell.Biol.* 30, 97 (1966)
- DAS, M.L., S. ORRENIUS and L. ERNSTER: On the fatty acid and hydrocarbon hydroxylation in rat liver microsomes. *Europ.J.Biochem.* 4, 519 (1968)
- DÜNGES, W. and G.F. KAHL: Metabolism of metyrapone by a soluble enzyme system in rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.* 267, 293 (1970)
- ERICKSON, R.E., R.J. ERTEL and F. UNGAR: Effect of Su-4885 on steroid 18-hydroxylation in the mouse adrenal in vitro. *Endocrinology* 78, 343 (1966)
- ERNSTER, L. and S. ORRENIUS: Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes. *Fed.Proc.* 24, 1190 (1965)
- ESTABROOK, R.W., D.Y. COOPER and O. ROSENTHAL: The light reversible carbon monoxide inhibition of steroid C₂₁-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem.Z.* 338, 741 (1963)
- ESTABROOK, R.W., A. HILDEBRANDT and V. ULLRICH: Oxygen interaction with reduced cytochrome P-450. *Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem.* 349, 1605 (1968)
- FAHIM, M.S. and D.G. HALL: Effect of ovarian steroids on hepatic metabolism. I. Progesterone. *Amer.J.Obstet. Gynec.* 106, 183 (1970)
- FAHIM, M.S., D.G. HALL and T. JONES: Effect of ovarian steroids on hepatic metabolism. II. Estrogens. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 109, 558 (1971)

- FOUTS, J.R.: The metabolism of drugs by subfractions of hepatic microsomes. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 6, 373 (1961)
- FOUTS, J.R. and B.B.BRODIE: The enzymatic reduction of chloramphenicol, p-nitrobenzoic acid and other aromatic nitro compounds in mammals. *J.Pharmacol.exp.Ther.* 119, 197 (1957)
- FOUTS, J.R. and L.A.ROGERS: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats. *J.Pharmacol.exp.Ther.* 147, 112 (1965)
- GIGON, P.L., T.E.GRAM and J.R.GILLETTE: Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Effect of drug substrates. *Molec.Pharmacol.* 5, 109 (1969)
- GILLETTE, J.R.: Mechanisms of oxidation by enzymes in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 16, 109 (1969)
- GILLETTE, J.R., B.B.BRODIE and B.N.LADU: The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. *J.Pharmacol.exp.Ther.* 119, 532 (1957)
- GILLETTE, J.R., J.J.KAMM and H.H.SASAME: Mechanism of p-nitrobenzoate reduction in liver: the possible role of cytochrome P-450 in liver microsomes. *Molec.Pharmacol.* 4, 54 (1968)
- GILLETTE, J.R., A.H.CONNEY, G.J.COSMIDES, R.W.ESTABROOK, J.R.FOUTS and G.J.MANNERING (Eds.): *Microsomes and drug oxidations*. New York, London 1969
- GLAUMANN, H.: Chemical and enzymatic composition of microsomal subfractions from rat liver after treatment with phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Chem.Biol.Interactions* 2, 369 (1970)
- GNOSSELIUS, Y., H.THOR and S.ORRENIUS: A comparative study of the effects of phenobarbital and 3,4-

- benzpyrene on the hydroxylating system of rat liver microsomes. *Chem.Biol.Interactions* 1, 125 (1969/70)
- GUSTAFSSON, J.-A., B.P.LISBOA and J.SJÖVALL: Studies on the metabolism of C₁₉-steroids in rat liver. 2. Biosynthesis of hydroxylated derivatives of 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one in rat liver microsomes. *Europ.J.Biochem.* 5, 437 (1968) a
- GUSTAFSSON, J.-A., B.P.LISBOA and J.SJÖVALL: Studies on the metabolism of C₁₉-steroids in rat liver. 3. Isolation and biosynthesis of 5 α -androstane-3 α -ols in rat liver microsomes. *Europ.J.Biochem.* 6, 317 (1968) b
- HAGINO, N., J.A.RAMALEY and R.A.GOSHI: Inhibition of estrogen-induced precocious ovulation by phenobarbital in the rat. *Endocrinology* 79, 451 (1966)
- HAYAISHI, O., S.ROTHBERG and A.H.MEHLER: Studies on enzymatic oxygenation. 130th. Am. Chem. Soc. Meeting (1956), p.53
- HERNANDEZ, P.N., P.FAZEL and J.R.GILLETTE: Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase - II. The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on carbon monoxide sensitive and insensitive azoreductase activities. *Biochem. Pharmacol.* 16, 1877 (1967)
- HILDEBRANDT, A.G., H. REIFER and R.W.ESTABROOK: Cytochrome P-450 of liver microsomes - one pigment or many. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 30, 607 (1968)
- HILDEBRANDT, A.G. and R.W.ESTABROOK: Spectrophotometric studies of cytochrome P-450 of liver microsomes after induction with phenobarbital and 3-methylcholanthrene. In: GILLETTE et al. (1969), p.331
- HILDEBRANDT, A.G., K.C.LEIBMAN and R.W.ESTABROOK: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 37, 477 (1969)

- IMAI,Y. and R.SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. Biochem.biophys. Res.Commun. 22, 620 (1966)
- IMAI,Y., A.ITO and R.SATO: Evidence for biochemically differenz types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. J.Biochem.(Tokyo) 60, 417 (1966)
- IMAI,Y. and R.SATO: Studies on the substrate interactions with P-450 in drug hydroxylation by liver microsomes. J.Biochem.(Tokyo) 62, 239 (1967)
- JENKINS,J.S., J.W.MEAKIN and D.H.NELSON: A comparison of the inhibitory effects of 2-methyl-1,2-bis (3-pyridyl)-1-propanone and amphenone B on adrenal cortical secretion in the dog. Endocrinology 64, 572 (1959)
- JICK,H. and L.SHUSTER: The turnover of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome c reductase in the liver of mice treated with phenobarbital. J.biol.Chem. 241, 5366 (1966)
- JORI,A., A.BIANCHETTI and P.E.PRESTINI: Effect of contraceptive agents on drug metabolism. Europ.J.Pharmacol. 7, 196 (1969)
- JUCHAU,M.R. and J.R.FOUTS: Effects of norethynodrel and progesterone on hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme systems. Biochem.Pharmacol. 15, 891 (1966)
- KAHL,G.F.: Experiments on the metyrapone reducing microsomal enzyme system. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266, 61 (1970) a
- KAHL,G.F.: Untersuchungen zu Stoffwechsel und Wirkung von Metyrapon in der Leberzelle. Habilitations-schrift, Mainz 1970 b
- KAHL,G.F. and K.J.NETTER: The effect of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxidation. Biochem.Pharmacol. 19, 27 (1970)

- KAHL, R., K.H. TÜTTENBERG, F. NIEDERMEIER and G.F. KAHL:
Evidence for oxidative metabolism of metyrapone
in rat liver microsomes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
Pharmac. 282 Suppl., R 44 (1974)
- KAMIN, H., B.S.S. MASTERS, Q.H. GIBSON and C.H. WILLIAMS:
Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. Fed.Proc.
24, 1164 (1965)
- KATO, R., T. OSHIMA and A. TAKANAKA: Studies on the mecha-
nism of nitroreduction by rat liver. Molec.Phar-
macol. 5, 487 (1969)
- KERSTEN, H. und H.J. STAUDINGER: Der Einfluß von Butazolidin
auf die Cortisoninaktivierung in Leberhomogenaten.
Klin.Wschr. 34, 523 (1956)
- KINOSHITA, T. and S. HORIE: Studies on P-450. III. On the
absorption spectrum of P-450 in rabbit liver micro-
somes. J.Biochem. (Tokyo) 61, 26 (1967)
- KORUS, W., H. SCHRIEFERS and W. DIRSCHEL: Über den Stoff-
wechsel des Cortisons in der Rattenleber unter dem
Einfluß von 3,5-Dioxo-1,2-diphenyl-4-n-butyl-
pyrazolon (Butazolidin). Arzneimittel-Forsch. 6,
596 (1956)
- KRAULIS, I. and M.K. BIRMINGHAM: Hydroxylation sequences in
rat adrenal steroids and effects of Su-4885 on C₁₈-
oxygenation. Fed.Proc. 22, 530 (1963)
- KRAULIS, I., H. TRAIKOV, M.P. LI, C.P. LANTOS and M.K.
BIRMINGHAM: The reduction of Su-4885 by adrenal
glands and other tissues and its inhibition by
ACTH. Can.J.Biochem. 46, 463 (1968)
- KRUSKAL, W.H. and W.A. WALLIS: Use of ranks in one criterion
variance analysis. J.American Statistical Associa-
tion 47, 583 (1952)
- KUNTZMAN, R., M. JACOBSON, K. SCHNEIDMAN and A.H. CONNEY:
Similarities between oxydative drug-metabolizing
enzymes and steroid hydroxylase in liver microsomes.
J.Pharmacol.exp.Ther. 146, 280 (1964)

- KUNTZMAN, R., M. SANSUR and A. H. CONNEY: Effect of drugs and insecticides on the anaesthetic action of steroids. *Endocrinology* 77, 952 (1965)
- KUNTZMAN, R., M. JACOBSON and A. H. CONNEY: Effect of phenylbutazone on cortisol metabolism in man. *Pharmacologist* 8, 195 (1966)
- LaDU, B. N., L. GAUDETTE, N. TROUSOF and B. B. BRODIE: Enzymatic dealkylation of aminopyrine (pyramidon) and other alkylamines. *J. biol. Chem.* 214, 741 (1955)
- LEE, S. G. and C. CHEN: Liver microsomes demethylaxion of mestranol and some of its effects on drug metabolism. *Steroids* 18, 565 (1971)
- LEIBMAN, K. C.: Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations. *Fed. Proc.* 25, 417 (1966)
- LEIBMAN, K. C.: Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations. *Molec. Pharmacol.* 5, 1 (1969)
- LEIBMAN, K. C., A. G. HILDEBRANDT and R. W. ESTABROOK: Spectrophotometric studies of interactions between various substrates in their binding to microsomal cytochrome P-450. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 36, 789 (1969)
- LEIBMAN, K. C. and R. W. ESTABROOK: Effects of extraction with isooctane upon the properties of liver microsomes. *Molec. Pharmacol.* 7, 26 (1971)
- LEVIN, W.: Decreased uterotrophic potency of oral contraceptives in rats pretreated with phenobarbital. *Endocrinology* 83, 149 (1968)
- LEVIN, W., R. M. WELCH and A. H. CONNEY: Effect of phenobarbital and other drugs on the metabolism and uterotrophic action of estradiol-11 β and estrone. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 159, 362 (1968)
- LEYBOLD, K. und H. J. STAUDINGER: Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. *Biochem. Z.* 331, 389 (1959)
- LEYBOLD, K. und H. J. STAUDINGER: Wirkung von Pharmaka auf den Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. *Klin. Wschr.* 39, 952 (1961)

- LIDDLE, G.W., D. ISLAND, H. ESTER and G.M. TOMKINS:
Modification of adrenal steroid patterns in man
by means of an inhibitor of 11- β -hydroxylase.
J.clin.Invest. 37, 912 (1958)
- LIDDLE, G.W., H.L. ESTER, J.W. KENDALL, W.C. WILLIAMS and
A.W. TOWNES: Clinical application of a new test
of pituitary reserve. J.clin.Endocr. 19, 879 (1959)
- LIER, A: Zur Frage der Beeinflussung des oxidativen und
reduktiven Fremdstoffumbaus in den Mikrosomen der
Rattenleber durch Metyrapon. Inauguraldissertation,
Mainz 1972
- LISBOA, B.P., J.-A. GUSTAFSSON and J. SJÖVALL: Studies on
the metabolism of C₁₉-steroids in rat liver. 1. Hydro-
xylation of testosterone in rat liver microsomes.
Europ.J.Biochem. 4, 496 (1968)
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.biol.Chem. 193, 265 (1961)
- MASON, H.S.: Mechanism of oxygen metabolism. Advanc.
Enzymol. 19, 79 (1957)
- MAZEL, P. and P.H. HERNANDEZ: The effects of phenobarbital
and 3-methylcholanthrene on CO sensitive and insen-
sitive azoreductase activities. Fed.Proc. 26, 461
(1967)
- MCGUIRE, J.S. and G.M. TOMKINS: The effects of thyroxin
administration on the enzymic reduction of Δ_4 -3-
ketosteroids. J.biol.Chem. 234, 791 (1959)
- MCGUIRE, J.S. and G.M. TOMKINS: The heterogeneity of
 Δ_4 -3-ketosteroid reductases. J.biol.Chem. 235,
1634 (1960)
- MCGUIRE, J.S., V.W. HOLLIS Jr. and G.M. TOMKINS: Some
characteristics of the microsomal steroid reduc-
tases (5 α) of rat liver. J.biol.Chem. 235, 3112
(1960)

- MINCK, K., G.F. KAHL, R. KERN, A. LIER and G. NISSEN:
Influence of metyrapone and hypoxia on neoprontosil
and acetanilide metabolism in isolated rat livers.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 274 Suppl,
R 79 (1972)
- MITOMA, C., H.S. POSNER, H.C. REITZ and S. UDENFRIEND:
Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds.
Archs Biochem. Biophys. 61, 431 (1956)
- MIYAKE, Y., J.L. GAYLOR and H.S. MASON: Properties of a
submicrosomal particle containing P-450 and flavo-
protein. J. biol. Chem. 243, 5788 (1968)
- MUELLER, G.C. and J.A. MILLER: The reductive cleavage of
4-dimethylaminoazobenzene by rat liver: reactivation
of carbon dioxide treated homogenates by ribo-
flavin-adenine dinucleotide. J. biol. Chem. 185,
145 (1950)
- MUELLER, G.C. and G. RUMNEY: Formation of 6 β -hydroxy and
6-keto derivatives of estradiol-16-C¹⁴ by mouse
liver microsomes. J. Amer. chem. Soc. 79, 1004 (1957)
- NARASIMHULU, S., D.Y. COOPER and O. ROSENTHAL: Spectro-
photometric properties of a triton-clarifed steroid
21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes.
Life Sci. 4, 2101 (1965)
- NETTER, K.J.: Grundlagen des Arzneimittelstoffwechsels.
Arzneimittel-Forsch. 22, 285 (1972)
- NETTER, K.J. and G. SEIDEL: An adaptively stimulated
O-demethylating system in rat liver microsomes
and its kinetic properties. J. Pharmacol. exp. Ther.
146, 61 (1964)
- NETTER, K.J., S. JENNER und K. KAJUSCHKE: Über die Wirkung
von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittel-
abbau. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.
259, 1 (1967)
- NETTER, K.J., G.F. KAHL and N.P. MAGNUSSEN: kinetic experiments
on the binding of metyrapone to liver microsomes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 265, 205 (1969)

- NOCKE-FINCK, L., H.BREUER und D.REIMERS: Wirkung von Rifampicin auf den Menstruationszyklus und die Östrogenausscheidung bei Einnahme oraler Kontrazeptiva. Dtsch.med.Wschr. 98, 1521 (1973)
- O'MALLEY, K., I.H.STEVENSON and W.ALEXANDER: Increased antipyrine half-life in women taking oral contraceptives. Scot.med.J. 15, 454 (1970)
- O'MALLEY, K., I.H.STEVENSON and J.CROOKS: Impairment of human drug metabolism by oral contraceptives. Clin. Pharm. Ther. 13, 552 (1972)
- OMURA, T. and R.SATO: A new cytochrome in liver microsomes. J.biol.Chem. 237, 1375 (1962)
- OMURA, T. and R.SATO: The carbonmonoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J.biol.Chem. 239, 2370 (1964)
- OMURA, T., R.SATO, D.Y.COOPER, O.ROSENTHAL and R.W. ESTABROOK: Functions of cytochrome P-450 of microsomes. Fed.Proc. 24, 1181 (1965)
- ORRENJUS, S. and L.ERNSTER: Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver microsomes. Biochem.Biophys.Res.Comm. 16, 60 (1964)
- PALADE, G.E.: Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In: GAEBLER, O.H. (Ed.): Enzymes, units of biological structure and function. New York 1956, p.185
- PANGELS, G. und H.BREUER: Zelluläre Lokalisierung der 17 β -Oestradiol: 16 α -Hydroxylase. Naturwissenschaften 49, 106 (1962)
- POSNER, H.S., C.HITOMA and S.UDENFRIED: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. Arch.Biochem. 61, 431 (1956)
- POSNER, H.S., C.HITOMA, S.ROTHEBURG and S.UDENFRIED: Enzyme hydroxylation of aromatic compounds. III. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. Archs Biochem. Biophys. 94, 280 (1961)
- REIMER, H.: Die Verstärkung der Abhängeschwindigkeit von Enzymen durch Glucocorticoide. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmac. 233, 184 (1958)

- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 235, 279 (1959)
- REMMER, H.: The induction of hydroxylating by drugs. FEBS Letters 16, 125 (1969)
- REMMER, H. und H.J.MERKER: Enzyminduktion im endoplasmatischen Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital. Klin.Wschr. 41, 276 (1963)
- REMMER, H., J.B.SCHENKMAN, R.W.ESTABROOK, H.SASAME, J.R.GILLETTE, S.NARASIMHULU, D.Y.COOPER and O.ROSENTHAL: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Molec.Pharmacol. 2, 187 (1966)
- REMMER, H., J.B.SCHENKMAN and H.GREIM: Spectral investigations on cytochrome P-450. In: GILLETTE et al. 1969, p.371
- RUBIN, A., T.R.TEPHLY and G.J.MANNERING: Kinetics of drug metabolism by hepatic microsomes. Biochem.Pharmacol. 13, 1007 (1964)
- RÜMKE, C.L. and J.NORDHOEK: The influence of lynestrenol on the rate of metabolism of phenobarbital, phenytoin and hexobarbital in mice. Europ.J.Pharmacol. 6, 163 (1969)
- SAMUELS, L.T., C.McCAULEY and D.M.SELLERS: Metabolism of steroids by tissues. II. The enzyme destruction of testosterone by liver tissue. J.biol.Chem. 168, 477 (1947)
- SANZARI, N.P. and F.G.PERON: Influence of metopirone on substrate-supported hydroxylation of DOC by rat adrenal mitochondria. Steroids 8, 929 (1966)
- SASAME, H.A. and J.R.GILLETTE: Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. Molec. Pharmacol. 5, 123 (1969)

- SASAME, H.A. and J.R. GILLETTE: Studies on the inhibitory effects of various substances on drug metabolism by liver microsomes: the effects of nicotinamide in altering the apparent mechanism of inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 19, 1025 (1970)
- SCHENKMAN, J.B., H. REMMER and R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec. Pharmacol.* 3, 113 (1967)
- SCHENKMAN, J.B. and R. SATO: The relationship between the pH-induced spectral change of the hepatic microsomal mixed-function oxidase. *Molec. Pharmacol.* 4, 613 (1968)
- SCHENKMAN, J.B., H. GREIM, M. ZANGE and H. REMMER: On the problem of possible other forms of cytochrome P-450 in liver microsomes. *Biochim. biophys. Acta* 171, 23 (1969)
- SCHNEIDER, J.J. and P.M. HORSTMANN: Effects of incubating DOC with various rat tissues. *J. biol. Chem.* 191, 327 (1951)
- SELYE, H.: Adaptive steroids: retrospect and prospect. *Perspect. biol. med.* 13, 343 (1970) a
- SELYE, H.: Pharmaco-chemical interrelations among catalytic steroids. *Rev. canad. Biol.* 29, 49 (1970) b
- SHOEMAN, D.W., M.D. CHAPLIN and G.J. MANNERING: Induction of drug metabolism. III. Further evidence for the formation of a new P-450 hemoprotein after treatment of rats with 3-methylcholanthrene. *Molec. Pharmacol.* 5, 412 (1969)
- SLADEK, N.E. and G.J. MANNERING: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene-treated rats. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 24, 668 (1966)
- SOLYMOSS, B., H.G. CLASSEN and S. VARGA: Increased hepatic microsomal activity induced by spironolactone and other steroids. *Proc. soc. exp. Biol. (N.Y.)* 132, 940 (1969)

- SOMOGYI, A., K. KOVACS, B. SOLYMOS, R. KUNTZMAN and A. H. CONNEY: Suppression of 7,12-dimethylbenz (α) anthracene-produced adrenal necrosis by steroids capable of inducing aryl hydrocarbon hydroxylase. *Life Sci.* 10, 1261 (1971)
- SOUTHERN, A. L., G. G. GORDON, S. TOCHIMOTO, E. KRIKUN, D. KRIEGER, M. JACOBSON and R. KUNTZMAN: Effect of N-phenylbarbital (phetharbital) on the metabolism of testosterone and cortisol in man. *J. clin. Endocr.* 29, 251 (1969)
- SOYKA, J. F. and R. J. LONG: In vitro inhibition of drug metabolism by metabolites of progesterone. *J. Pharmac. exp. Ther.* 182, 320 (1972)
- SPRUNT, J. G., M. C. K. BROWNING and D. M. HANNAH: Some aspects of the pharmacology of metyrapone. *Mem. Soc. Endocrinol.* 17, 193 (1967)
- STRITTMATTER, C. F. and E. G. BALL: The intracellular distribution of cytochrome components and of oxidative enzyme activity in rat liver. *J. Cellul. Comp. Physiol.* 43, 57 (1954)
- SWEAT, M. J., J. S. DUTCHER, R. B. YOUNG and M. L. BRYSON: Adrenal gland steroid C-21 cytochrome P-450 reductase. *Biochemistry* 8, 4956 (1969)
- TEPHLY, T. R. and G. J. MANNERING: Inhibition of drug metabolism. V. Inhibition of drug metabolism by steroids. *Molec. Pharmacol.* 4, 10 (1968)
- TOMKINS, G. M.: The enzymatic reduction of Δ^4 -3-ketosteroids. *J. biol. Chem.* 225, 13 (1957)
- ULRICH, V.: On the hydroxylation of cyclohexane in rat liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 350, 357 (1969)
- URQUHART, J., F. E. YATES and A. J. HERBST: Hepatic regulation of adrenal corticoid function. *Endocrinology* 64, 816 (1959)

- WADA, F., H. SHIBATA, M. GOTO and Y. SAKAMOTO: Participation of the microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in ω -oxidation of fatty acids. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) 162, 518 (1968)
- WELCH, R. M., W. LEVIN and A. H. CONNEY: Insecticide inhibition and stimulation of steroid hydroxylases in rat liver. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 155, 167 (1967)
- WELCH, R. M., W. LEVIN and A. H. CONNEY: Stimulatory effect of phenobarbital on the metabolism in vivo of estradiol-17 β and estrone in the rat. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 160, 171 (1968)
- WENZEL, M. und H. J. STAHL: Verstärkte Hydroxylierung von Östrogenen beim Menschen nach Arzneimittelgabe. Nachweis durch HTO-Analyse des Körperwassers. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 351, 761 (1970)
- WERK, E. E. Jr., J. MCGEE and L. J. SHOLITON: Effect of diphenylhydantoin on cortisol metabolism in man. *J. clin. Invest.* 43, 1824 (1964)
- WETTSTEIN, A., R. NEHER und H. J. URECH: Über Umwandlung von Progesteron und 16-Hydroxyprogesteron durch Enzyme tierischer Gewebe. *Helv. chim. Acta* 42, 956 (1959)
- WILLIAMS, C. H. Jr. and H. KAMIN: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c-reductase of liver. *J. biol. Chem.* 237, 587 (1962)
- WILLIAMSON, D. G. and V. J. O'DONNELL: Mechanism of metopirone inhibition of a soluble adrenal steroid 11 β -hydroxylase. *Can. J. Biochem.* 45, 153 (1967)
- WISWELL, J. G. and L. T. SAMUELS: The metabolism of progesterone by liver tissue in vitro. *J. biol. Chem.* 201, 155 (1953)
- ZONDEK, B.: Über das Schicksal des Follikelhormons (Follikulin) im Organismus. *Skand. Arch. Physiol.* 70, 133 (1934)

LEBENS LAUF

Am 21.7.1947 wurde ich als drittes Kind des Bundesbahndirektors Paul Tüttenberg und seiner Frau Anna, geb. Röttgen, in Passau geboren. Ich besuchte die Grundschule in Regensburg und Mainz und anschließend das humanistische Rabanus-Maurus-Gymnasium in Mainz. 1966 bestand ich die Reifeprüfung. Ich studierte Medizin in Mainz und München und legte 1971 in Mainz mein Medizinisches Staatsexamen ab. Im Jahr 1972 war ich als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz tätig, 1973 an den Universitätskliniken Mainz. Im September 1973 erhielt ich die Approbation. Anschließend leistete ich meinen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit führte ich von Januar 1972 bis März 1973 im Pharmakologischen Institut der Universität Mainz durch.

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 131 Ruf (06 41) 2 17 12